



# Etude de la réponse immunitaire de la cicadelle Circulifer haematoceps au cours de l'infection par Spiroplasma citri

Remi Eliautout

## ► To cite this version:

Remi Eliautout. Etude de la réponse immunitaire de la cicadelle *Circulifer haematoceps* au cours de l'infection par *Spiroplasma citri*. Immunologie. Université de Bordeaux, 2014. Français. <NNT : 2014BORD0260>. <tel-01148274>

**HAL Id: tel-01148274**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01148274>**

Submitted on 4 May 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse présentée  
pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie  
Spécialité Biologie-Santé

Par Rémi ELIAUTOUT

**ETUDE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DE LA CICADELLE *CIRCULIFER*  
*HAEMATOCAPS* LORS DE L'INFECTION PAR *SPIROPLASMA CITRI***

Sous la direction de Nathalie ARRICAU-BOUVERY,  
Chargée de Recherche à l'INRA de Bordeaux

Soutenue le 28 Novembre 2014

**Membres du Jury**

M. MOREAU J. F., Praticien Hospitalier et Professeur à l'Université de Bordeaux  
Mme BRAQUART-VARNIER C., Maître de conférences à l'Université de Poitiers  
M. SICARD M., Professeur à l'Université de Montpellier  
M. HEDDI A., Professeur à l'INSA de Lyon

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur



*À ma femme Aurore  
et mon fils James*



## Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de l'Unité Mixte de Recherche 1332 Biologie du Fruit et Pathologie (Institut National de la Recherche Agronomique et Université de Bordeaux), dirigée par Mr Thierry Candresse, sous la direction de Mme Nathalie Arricau-Bouvery.

Je tiens tout d'abord à remercier Mr Alain Blanchard pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son laboratoire. Je souhaite également remercier Mr Jean-François Moreau de me faire l'honneur de présider ce jury. J'en profite également pour remercier toute l'équipe de l'UMR 5164 qui m'a accueilli au cours du Master 1 et du Master 2 et qui a su me transmettre sa passion pour la recherche. Mon attention se porte vers Vincent Pitard, Julie Dechanet-Merville, Sonia Netzer, Sophie Daburon, Myriam Capone, Santiago Gonzales et Aurore Morello pour le Master 1 mais aussi Séverine Loizon, Julien Dallene, Cécile Le Scanf-Terrien, Maria Mamani Matsuda, Marianne Guenot et la regrettée Charlotte Behr pour le Master 2. Ces 2 années ont été intenses mais tellement enrichissantes!

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Mme Christine Braquart-Varnier et Mr Mathieu Sicard d'avoir accepté d'examiner et de juger ce manuscrit. Je remercie également l'équipe de l'UMR 7267 de Poitiers qui m'a également accueilli pour de nombreuses expériences et mises au point en tout genre pendant la dernière année de thèse. Pour ça, je remercie tout particulièrement Maryline Raimond, Emile Bere et bien sûr Christine.

Je remercie également Mr Abdelaziz Heddi d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. J'en profite pour remercier également toute son équipe de l'INSA de Lyon et notamment Agnès Vallier, Carole Vincent-Monégat et Florent Masson qui m'ont accueilli dans leur laboratoire et m'ont permis de réaliser des expériences cruciales pour la finalité de mon travail de thèse. Vraiment merci à vous pour votre sympathie et votre disponibilité.

Ces 3 années de thèse ont été extraordinaires. À aucun moment, je ne suis venu au laboratoire en traînant des pieds. Qu'il pleuve ou qu'il vente, chaque journée a été merveilleuse! Et ce pour la simple et bonne raison, que mon entourage n'a été composé que de personnes formidables, généreuses, ouvertes et je dois le dire, patientes... C'est à vous tous que je dois cette thèse, vous qui m'avez accepté tel que je suis et tel que je compte rester. Pour tout cela, je vous remercie du fond du cœur! Et je ne parle pas seulement du laboratoire mais aussi de tous mes amis, mes proches, ma famille, ma femme et mon fils. Vous qui m'avez accompagné tout au long de ce parcours au cours duquel j'ai peut-être manqué d'attention et de discernement. À vous tous je dis MERCI!

Je remercie donc Nathalie Arricau-Bouvery! Ma chef, mon mentor, ma victime, ma chance! Comment trouver mieux après ça? Ta capacité d'encadrement n'a d'égale que ton incapacité

à t'en rendre compte... Tu as été formidable Nathalie et je ne le dirai jamais assez! Tu as été d'une grande patience et je ne saurai te remercier assez pour ça. D'une gentillesse sans limite hormis quand il s'agit de m'éliminer au porte des 1/4 de finale du tournoi babyfoot! J'ai tellement aimé ces 3 années de thèse sous ta direction! J'ai tellement appris! Je serai heureux d'en retenir au moins la moitié... J'ai pu rire, chanter, blaguer et tu as su m'accepter malgré mes nombreux défauts. Désolé pour ton mal de crâne devenu chronique et pour toutes les angoisses que j'ai pu générer par mon insouciance. Bref tu es Nathalie Bouvery et je ne t'oublierai jamais. Merci pour TOUT. On se retrouve pour ton HDR?

Je remercie également Marie-Pierre Dubrana ou Mpi pour les intimes... Chaque jour démarre par un « Marie-Pierre me voilà! » mais si tu n'avais pas été là, tout le monde au labo aurait pu chanter « Marie-Pierre il galère! ». Je n'aime pas me répéter mais il faut l'avouer, tu as été incroyable! Tu as tellement fait! Et toi qui ne te sens pas capable de faire une thèse... J'ai pris un tel plaisir à travailler avec toi! Tu as été un véritable rayon de soleil pendant ces 3 années et tu vas me manquer, à un point que tu ne peux imaginer! Promet-moi de m'apprendre à faire du milieu SP4 un jour! Allez je m'arrête là car il y aurait tellement à dire... Continue de réchauffer le cœur du laboratoire comme tu sais si bien le faire... Ah oui j'oubliais... toutes mes félicitations pour le concours cocktail que tu as remporté haut la main. Merci pour toutes les manip réalisées dans l'urgence, les injections, les dissections, les milieux de cultures, les extractions d'ARN, les PCR et qRT-PCR. Tu vois, il y a tellement à dire... mais au final rien ne vaut mieux qu'un « Marie-Pierre me voilà! ». Je t'embrasse bien!

Je remercie aussi Colette Saillard ou Coco pour les intimes! Elle est certainement la seule personne à m'avoir crié dessus, à m'avoir botté le cul à chaque fois que je le méritais ou que je me dispersais un peu trop... et je dois le reconnaître... cela a été une très bonne chose! Je te remercie pour m'avoir éduqué avec autant de vigueur que pour tes propres étudiants de thèse. Mais au-delà de ça, tu as su te mettre en retrait pour que Nathalie apprenne à se faire confiance en tant qu'excellente directrice de thèse qu'elle est! Merci donc pour ton enseignement fait de rigueur, d'humilité et de bienveillance. J'ai tellement appris grâce à toi et pour tout ça je tenais à te remercier du fond du cœur. Merci aussi pour ton humour, ta joie de vivre et la force que tu dégages. Puisse ta retraite t'apporter le bonheur que tu mérites... Puisse-tu simplement récolter ce que tu as semé pendant toutes ces années. Tu resteras à jamais gravé dans ma mémoire... Il est des personnes que l'on rencontre et que l'on n'oublie jamais! Je suis si fier d'avoir été le dernier étudiant de thèse à avoir suivi ton enseignement et je me joins à tous mes prédécesseurs pour t'envoyer le plus tendre des baisers. Bonne route Colette... et merci encore pour tout!

Encore merci à toute l'Unité pour votre gentillesse et votre sympathie. Je n'oublierai jamais tout ce que vous avez fait pour moi au cours de cette thèse. Je le redis, j'ai pris un plaisir immense à venir chaque matin au laboratoire! Je vous embrasse tous très fort et vous souhaite une bonne continuation...

Évidemment, il n'y a pas que les personnes du laboratoire qui m'ont aidé pendant ces trois années. Il y a aussi mes amis, ceux que j'ai rencontré en master : Alice, Adrien, Rémi, Anaïs, Élodie, Camille, mon Dada, Liliane, Marion et avec qui j'ai passé des moments inoubliables! Merci à chacun de vous les amis, vous qui m'avez vu devenir Papa de mon adorable James! J'espère vous revoir très bientôt, sur Bordeaux ou sur Poitiers...

Je remercie également les amis de plus longues dates, de licence et du lycée qui m'ont suivi pendant cette thèse et qui m'ont soutenu de près comme de loin pendant ces 3 années!

Enfin je tiens à remercier ma famille, mes parents tout d'abord... Maman, Papa, je suis docteur! Votre fils est docteur! Il est loin le bon temps où je tentais des expériences au fond du garage... et en même temps, ça fera des choses à raconter à James quand il sera plus grand! En tout cas, merci à vous 2 pour m'avoir donné la chance d'aller à l'Université et faire ce qu'il me plaît. Je n'ai jamais manqué de rien et j'espère que j'apporterai au moins autant de bonheur à James que j'en ai eu à grandir avec vous. Je remercie aussi mon grand frère Jonathan qui a toujours été un repère pour moi ainsi que ma petite sœur Déborah pour la simple et bonne raison que je l'aime du fond du cœur! Merci à vous 4 d'avoir été là pour ma soutenance. J'en profite pour remercier également toute ma famille ainsi que ma belle-famille. Je vous aime tous!!

Pour terminer, il est évident qu'il y a 2 personnes sans qui je n'aurais jamais pu faire cette thèse. Il y a toi Aurore, ma chérie, l'amour de ma vie et il y a James, notre fils, notre trésor, notre sacré bonhomme! Merci à vous 2 mais merci surtout à toi Aurore, pour ta patience, ton amour, ta bienveillance et ta générosité. Je vous aime tellement! Merci encore pour tous ces matins de bonheur. Je vous ai retrouvé et désormais nous continuons notre chemin sur Poitiers avec je l'espère un second bébé....

Voilà, c'est fait!

Rémi



## Liste des communications à des congrès

**Eliautout R\***, Dubrana M-P., Vallier A., Braquart-Varnier C., Vincent-Monégat C., Saillard C., Heddi A., Arricau-Bouvery N. (2014) Etude du rôle de l'hexamérine dans l'activité phénoloxidase chez la cicadelle *Circulifer haematoceps* et de son rôle dans la réponse à *Spiroplasma citri*. Immuninv 2014. Dijon. pp 46 [Oral]

**Eliautout R.\***, Dubrana M-P., Vallier A., Braquart-Varnier C., Vincent-Monégat C., Saillard C., Heddi A., Arricau-Bouvery N. (2014) Etude du rôle de l'hexamérine dans l'activité phénoloxidase chez la cicadelle *Circulifer haematoceps* et de son rôle dans la réponse à *Spiroplasma citri*. 6<sup>èmes</sup> Journées des Doctorants SPE, 2014. Bordeaux. [Oral]

**Eliautout R.\***, Dubrana M-P., Vallier A., Braquart-Varnier C., Vincent-Monégat C., Saillard C., Heddi A., Arricau-Bouvery N. (2014) Variation de l'activité phénoloxidase chez la cicadelle *Circulifer haematoceps* au cours de l'infection par *Spiroplasma citri*. 14<sup>ème</sup> Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé. Arcachon. [Poster]

**Eliautout R.\***, Dubrana M-P., Vincent-Monégat C., Poirié M., Renaudin J., Heddi A., Saillard C., Arricau-Bouvery N. (2013) Mise en évidence d'une réponse immunitaire non-classique mais fonctionnelle chez un hémiptère vecteur de la bactérie *Spiroplasma citri*. 17 Colloque de Biologie de l'Insecte - CBI 2013. Montpellier. [Oral]

**Eliautout R.\***, Dubrana M-P., Vincent-Monégat C., Poirié M., Renaudin J., Heddi A., Saillard C., Arricau-Bouvery N. (2013) Mise en évidence d'une réponse immunitaire non-classique mais fonctionnelle chez un hémiptère vecteur de la bactérie *Spiroplasma citri*. 5<sup>èmes</sup> Journées des Doctorants SPE. Montpellier. [Oral]

**Eliautout R.\***, Dubrana M-P., Renaudin J., Saillard C., Arricau-Bouvery N. (2012) Réponse de la cicadelle *Circulifer haematoceps* vecteur de *Spiroplasma citri* à une infection bactérienne. Journées des Microbiologistes de l'INRA 2012. L'Isle-sur-la-Sorgue. [Poster]

**Eliautout R.\***, Dubrana M-P., Renaudin J., Saillard C., Arricau-Bouvery N. (2012) Caractérisation des composantes humorale et cellulaire de la réponse immunitaire à l'infection par *Spiroplasma citri*. 13<sup>ème</sup> Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé. Arcachon. [Poster]

**Eliautout R.\***, Dubrana M-P., Monégat C., Poirié M., Renaudin J., Heddi A., Saillard C., Arricau-Bouvery N. (2012) Composantes cellulaire et humorale de la réponse immunitaire de la cicadelle *Circulifer haematoceps* à l'infection par *Spiroplasma citri*. Immuninv 2012. Perpignan. [Poster]

\* auteur qui a présenté la communication ou le poster

# **Table des matières**

INTRODUCTION	11
I. Objectifs de la thèse	12
II. L'immunité des insectes	13
1. La réponse à une blessure physique	14
1. 1. La coagulation	14
1. 2. La mélanisation	16
2. La réponse à une infection	17
2. 1. La réponse humorale	17
2. 1. 1. Les récepteurs	17
2. 1. 1. 1. Les PeptidoGlycan Recognition Protein (PGRPs)	19
2. 1. 1. 2. Les $\beta$ GRPs/GNBPs	20
2. 1. 1. 3. Les transporteurs de lipides	22
2. 1. 1. 4. Les ThioEster containing Proteins (TEPs)	26
2. 1. 1. 5. Les Lectines de type C	26
2. 1. 1. 6. Les DSCAMs	28
2. 1. 1. 7. Dicer et la voie de l'interférence par ARN	29
2. 1. 2. Les effecteurs	30
2. 1. 2. 1. Les peptides antimicrobiens	30
2. 1. 2. 1. 1. Les peptides antimicrobiens riches en cystéine	30
2. 1. 2. 1. 2. Les peptides antimicrobiens riches en proline	32
2. 1. 2. 1. 3. Les peptides antimicrobiens riches en glycine	33
2. 1. 2. 1. 4. Les voies de régulation des peptides antimicrobiens	36
2. 1. 2. 2. Le Lysozyme	38
2. 1. 2. 3. Les Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS)	39
2. 2. La réponse cellulaire	40
2. 2. 1. Hématopoïèse et hémocytes	40
2. 2. 2. La phagocytose	41
2. 2. 3. L'encapsulation	41
2. 2. 4. La nodulation	42
III. Les spiroplasmes	43
1. Historique	43
2. Généralités	45
3. Classification et phylogénie	47
4. Hôte, transmission et pathogénicité	47
4. 1. Interaction spiroplasmes/plantes	47
4. 2. Interaction spiroplasmes/insectes	49
4. 3. Interaction spiroplasmes/crustacés	52
4. 4. Le modèle <i>S. citri</i> /Circulifer haematoceps	55
5. Spiroplasmes et immunité	58
5. 1. La drosophile	58
5. 2. Les crustacés	59
RESULTATS	61
I. Caractérisation du système immunitaire de <i>Circulifer haematoceps</i>	62
1. Caractérisation de la composante humorale	62
1. 1. Mise en évidence d'une activité phénoloxidase	62
1. 2. Mise en évidence d'une activité antibactérienne	66
2. Caractérisation de la composante cellulaire	67
2. 1. Identification des différents types d'hémocytes	67
2. 2. Etude de la phagocytose	73
2. 3. Mise en évidence d'une activité phénoloxidase	75
3. Identification des gènes d'immunité de <i>C. haematoceps</i>	76
3. 1. Hybridation soustractive d'ADNc	76
3. 2. Classement des ESTs par catégories fonctionnelles	80
3. 3. Recherche de gènes d'immunité	82
3. 4. Suivi de l'expression de 6 gènes d'intérêt lors de l'infection	84
II. Etude de la réponse immunitaire à l'infection par <i>S. citri</i>	88
1. Suivi de la croissance bactérienne	88

2. Phagocytose de <i>S. citri</i>	90
3. Activité phénoloxidase au cours de l'infection par <i>S. citri</i>	94
4. Etude fonctionnelle des gènes <i>hex</i> , <i>ddbp1</i> et <i>thx</i> au cours de l'infection par <i>S. citri</i>	95
4. 1. Efficacité de l'interférence par ARN	97
4. 2. Mesure de l'activité phénoloxidase après injection d'ARNdb <i>Hex</i> et <i>Thx</i>	97
4. 3. Suivi de la survie à l'infection par <i>S. citri</i> après injection d'ARNdb <i>Hex</i> .	101
4. 4. Suivi de la croissance bactérienne de <i>S. citri</i> après injection d'ARNdb <i>Hex</i>	103
DISCUSSION GÉNÉRALE	105
I. Le système immunitaire de <i>C. haematoceps</i>	106
1. La composante humorale	106
1. 1. Activité antibactérienne	106
1. 2. Activité phénoloxidase	108
1. 3. Gènes impliqués dans la réponse immunitaire de <i>C. haematoceps</i>	110
2. La composante cellulaire	112
II. La réponse à l'infection par <i>S. citri</i>	115
III. Conclusion générale	118
MATÉRIELS ET MÉTHODES	119
1. Ecologie et Microbiologie	120
1. 1. Elevage d'insecte	120
1. 2. Infection bactérienne	120
1. 3. Suivi de la charge bactérienne dans l'insecte	120
1. 4. Suivi de la mortalité	121
2. Biologie moléculaire	122
2. 1. Extraction de l'ARN total au TRIzol® et traitement à la DNase	122
2. 2. Electrophorèse sur gel d'agarose et dosage de l'ARN total	122
2. 3. RT-PCR quantitative en temps réel	123
2. 3. 1. Synthèse des ADNc par transcriptase reverse	123
2. 3. 2. PCR quantitative en temps réel	124
2. 4. Hybridation soustractive d'ADNc	125
2. 4. 1 Synthèse des ADNc	127
2. 4. 2. Digestion enzymatique et ligation des adaptateurs	127
2. 4. 3. Ligation des adaptateurs	128
2. 4. 4. Hybridation soustractive et amplification des ADNc soustraits	128
2. 4. 5. Clonage des ADNc soustraits	129
2. 4. 6. Extraction de l'ADN plasmidique et séquençage	130
2. 4. 7. Analyse des séquences et classification	130
2. 5. Interférence par ARN	131
2. 5. 1. Synthèse de l'ARN double brin	131
2. 5. 2. Vérification de l'efficacité de l'interférence par ARN	132
3. Biologie cellulaire et biochimie	132
3. 1. Extraction et caractérisation des hémocytes circulants	132
3. 2. Phagocytose et estimation du pourcentage d'hémocytes phagocytant	133
3. 3. Mise en évidence d'une activité antibactérienne	134
3. 4. Mesure des activités phénoloxidase et pro-phénoloxidase	135
BIBLIOGRAPHIE	137
ANNEXES	161





# Introduction

## I. Objectifs de la thèse

*Spiroplasma citri* est une bactérie phytopathogène transmise par la cicadelle *Circulifer haematocephus* (Bové et al., 1987; Omid et al., 2011). Malgré sa forte multiplication dans l'hémolymph de l'insecte, *S. citri* n'affecte pas la longévité de *C. haematocephus* (Lallemand, 1987; Markham, 1983). En revanche il a été montré chez la drosophile, que l'infection expérimentale par *S. citri* entraînait une forte mortalité associée à une forte multiplication bactérienne et une absence de réponse immunitaire dirigée contre la bactérie (Herren and Lemaitre, 2011). Aussi, l'absence de symptômes chez *C. haematocephus* suggère que le système immunitaire joue un rôle important dans la tolérance de la cicadelle vis-à-vis du spiroplasme. Le but de cette thèse a donc été d'étudier la réponse immunitaire de *C. haematocephus* au cours de l'infection par *S. citri*.

Comme le système immunitaire des cicadelles n'était pas connu, j'ai entrepris dans un premier temps la caractérisation de composantes humorale et cellulaire du système immunitaire de *C. haematocephus*. Ces éléments m'ont ensuite permis d'étudier la réponse immunitaire de *C. haematocephus* au cours de différentes infections bactériennes et de la comparer à celle mise en place lors d'une infection par *S. citri*.

Avant de présenter l'ensemble des résultats obtenus au cours ce travail, il me semble nécessaire de présenter les connaissances actuelles concernant le système immunitaire des insectes mais aussi le modèle d'étude que représente l'interaction entre *S. citri* et son insecte vecteur *C. haematocephus*.

## II. L'immunité des insectes

Les êtres vivants partagent leur environnement avec de nombreux micro-organismes ayant pour certains, un pouvoir pathogène. Pour faire face à cette menace, les organismes vertébrés comme invertébrés ont mis en place un système leur permettant de se défendre en cas d'agression : le système immunitaire. Son rôle est de répondre à cette agression et d'éliminer les micro-organismes pathogènes. L'efficacité du système immunitaire dépend de sa capacité à distinguer les éléments propres à l'organisme, appelés le Soi, des éléments étrangers, appelés le Non-Soi. L'immunité se définit alors comme l'ensemble des processus cellulaires et humoraux permettant la reconnaissance et l'élimination d'un micro-organisme pathogène en cas d'infection. C'est dans ce contexte que l'on distingue l'immunité innée et l'immunité adaptative.

L'immunité adaptative, présente uniquement chez les vertébrés, est un système très efficace dont la spécificité repose sur les réarrangements géniques visant à augmenter l'affinité des effecteurs de la composante humorale pour un pathogène. L'efficacité de l'immunité adaptative réside aussi dans la capacité de mémoire de la composante cellulaire, permettant à l'organisme de répondre de façon rapide et efficace à un pathogène déjà rencontré. L'immunité adaptative a longtemps été considérée comme le pivot central du système immunitaire. Le regain d'intérêt pour l'immunité innée fait suite aux travaux menés sur la drosophile mettant en évidence une importante conservation des différents effecteurs entre les vertébrés et les invertébrés. Les résultats de ces études, associés aux travaux menés chez l'homme, ont permis de décrire l'immunité innée comme la première ligne de défense dont la spécificité et l'efficacité en font un système suffisant chez les invertébrés et indispensable chez les vertébrés pour la mise en place d'une réponse adaptative.

Le sujet de thèse porte sur la caractérisation du système immunitaire d'un insecte du genre hémiptère appelé *Circulifer haematoceps* et de son rôle lors de l'infection par *S. citri*. À ce titre, je présenterai ici uniquement le système immunitaire des insectes. Celui-ci est formé d'une composante humorale regroupant les effecteurs produits par les cellules du corps gras (équivalent du foie chez les vertébrés) et les hémocytes (cellules immunitaires) et d'une composante cellulaire regroupant l'ensemble des processus immunitaires directement associés aux hémocytes (phagocytose, nodulation, encapsulement).

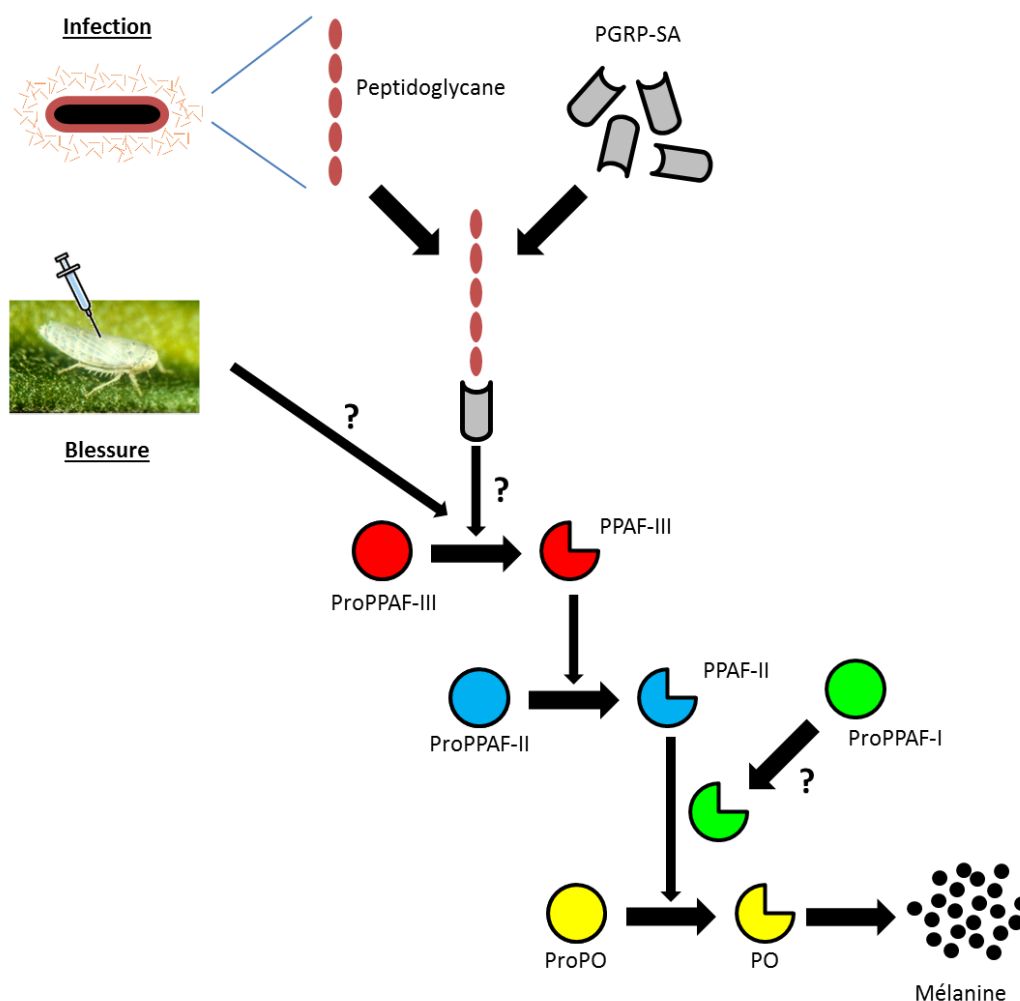
## **1. La réponse à une blessure physique**

Chez les insectes, la cuticule représente la première barrière à une infection. En cas d'agression physique, la blessure infligée entraîne une perte d'hémolymphe plus ou moins importante pouvant entraîner la mort de l'organisme. Aussi, l'intégrité de la cuticule est indispensable pour empêcher l'entrée et la dissémination de pathogènes divers dans l'hémolymphe. Pour éviter cela, les insectes ont su mettre en place différents systèmes agissant de façon précoce afin de réparer la cuticule endommagée.

### **1. 1. La coagulation**

Bien que son but premier soit de limiter la perte d'hémolymphe, la coagulation représente également une réponse immunitaire précoce, capable de protéger l'organisme contre un pathogène. Il s'agit d'un processus cellulaire et humoral comportant différentes étapes (Dushay, 2009; Theopold et al., 2002).

Premièrement la rupture de la cuticule entraîne, par un signal encore inconnu, l'activation des cellules immunitaires circulantes appelées hémocytes (Rowley and Ratcliffe, 1976). Les hémocytes activés libèrent des granules contenant des effecteurs tels que l'Hémolectine qui, en s'associant à des protéines du plasma (lipophorines), vont former une matrice dense qui va colmater la brèche dans la cuticule (Ratcliffe and Gagen, 1977). Cette même matrice va également permettre d'immobiliser et d'asphyxier les pathogènes qui s'y trouvent. En parallèle, une enzyme clé de l'immunité (la Pro-phénoloxidase) produite par les hémocytes va être libérée localement. Après activation par une cascade de sérines protéases (**voir paragraphe 1. 2.**), la Phénoloxidase produit de la mélanine qui va consolider la matrice ainsi que des radicaux libres qui vont éliminer les pathogènes (Nappi and Ottaviani, 2000). Les hémocytes vont à leur tour s'agglutiner autour de cette matrice pour former un caillot isolé du reste de l'hémolymphe. Le processus de coagulation se termine par la réparation de la cuticule et l'élimination du caillot. Ainsi la coagulation est un processus immunitaire complet et son efficacité permet aux insectes de se défendre contre de nombreux pathogènes.



**Figure 1** : Schéma simplifié de la cascade enzymatique permettant l'activation de la Pro-phénoloxidase. Dans le cas d'une infection bactérienne, le récepteur plasmatique PGRP-SA lie le peptidoglycane et entraîne par un mécanisme encore inconnu, l'activation d'une cascade protéolytique faisant intervenir les PPAF. Sous sa forme active la protéine PPAF-III clive et active la protéine PPAF-II. Sous sa forme active, la protéine PPAF-II n'a pas d'activité catalytique mais elle est nécessaire pour le clivage de la Pro-phénoloxidase par la protéine PPAF-I. Le mécanisme permettant l'activation de la protéine PPAF-I n'est pas connu. Après clivage, la Phénoloxidase est active et produit des quinones qui vont polymériser pour former la mélanine. PGRP-SA ; PeptidoGlycan Recognition Protein SA ; PPAF : Pro-Phénoloxidase Activating Factor ; ProPPAF : Pro Pro-Phénoloxidase Activating Factor ; ProPO : Pro-Phénoloxidase ; PO : Phénoloxidase. (Piao et al., 2005, 2007).

## **1. 2. La mélanisation**

La mélanisation est un processus immunitaire de la composante humorale initié lors d'une rupture de la cuticule ou d'une infection. Au cours du processus de coagulation, la mélanisation du caillot est contrôlée par une enzyme appelée Phénoloxidase. Cette enzyme est synthétisée sous forme inactive appelée Pro-phénoloxidase par les hémocytes avant d'être libérée dans le plasma (Ling and Yu, 2005). Les mécanismes impliqués dans l'activation de la Pro-phénoloxidase ont surtout été décrits lors d'une infection. En effet, il a été montré que certains antigènes bactériens ou fongiques, tels que le peptidoglycane (PGN), le lipopolysaccharide (LPS) ou encore le  $\beta$ -1,3-glucane, vont être reconnus par différents récepteurs présents dans l'hémolymph (voir paragraphe 2. 1.). Cette reconnaissance entraîne l'activation d'une cascade de réactions enzymatiques faisant intervenir de nombreuses sérines protéases appelés PPAF (Pro-Phenoloxidase Activating Factor) (fig. 1) (Cerenius et al., 2008; Charoensapsri et al., 2009). Sous sa forme active, la Phénoloxidase produit des quinones vont polymériser pour former de la mélanine (Söderhäll and Cerenius, 1998). La production de mélanine génère des radicaux libres tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont avoir un effet cytotoxique sur le pathogène (Nappi and Ottaviani, 2000). Ces radicaux libres ne sont pas sans danger pour l'organisme. Aussi, la réaction de mélanisation est contrôlée par différents types d'inhibiteurs dont la majorité appartient à la famille des Serpines (Serine protease inhibitor). Chez la drosophile, il a été montré que la serpine Spn27A régule négativement l'activation de la Pro-phénoloxidase (De Gregorio et al., 2002). Les inhibiteurs de la mélanisation sont majoritairement produits par l'organisme lui-même. Cependant, certains pathogènes sont capables d'induire la production d'inhibiteurs (Pacifastine) ou de les produire eux-mêmes afin d'échapper à la mélanisation (Toubarro et al., 2013). La réaction de mélanisation est un processus précoce et rapide. Dans de nombreux cas, son efficacité détermine le devenir de l'infection.

## **2. La réponse à une infection**

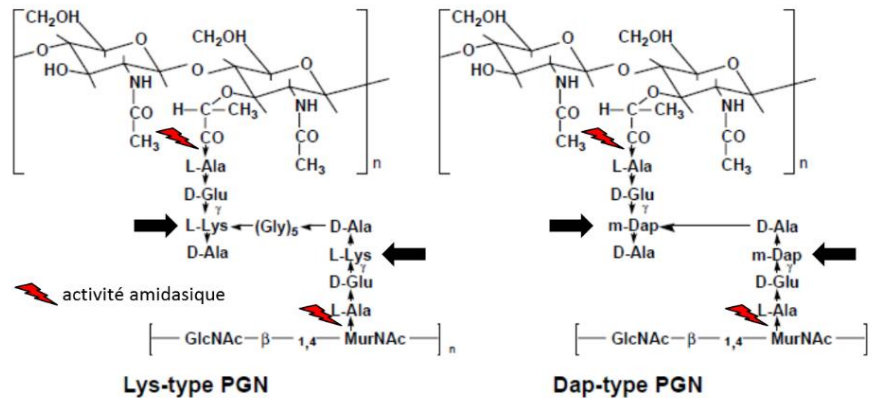
### **2. 1. La réponse humorale**

La réponse humorale se définit comme l'ensemble des processus permettant la reconnaissance des micro-organismes et la production d'effecteurs plasmatiques ayant une activité antimicrobienne. Au cours d'une infection, les organismes vertébrés comme invertébrés sécrètent des effecteurs plasmatiques ayant une activité lytique directe ou indirecte, permettant d'éliminer l'agent infectieux. Chez les insectes, la production de ces effecteurs est contrôlée par différentes voies de signalisation dont les voies Toll et voie Imd (**voir paragraphe 2. 1. 2. 1.**). Ces voies sont activées par la reconnaissance de composés le plus souvent membranaires, appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), par un grand nombre de récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition Receptor) qui assurent la spécificité de la réponse immunitaire.

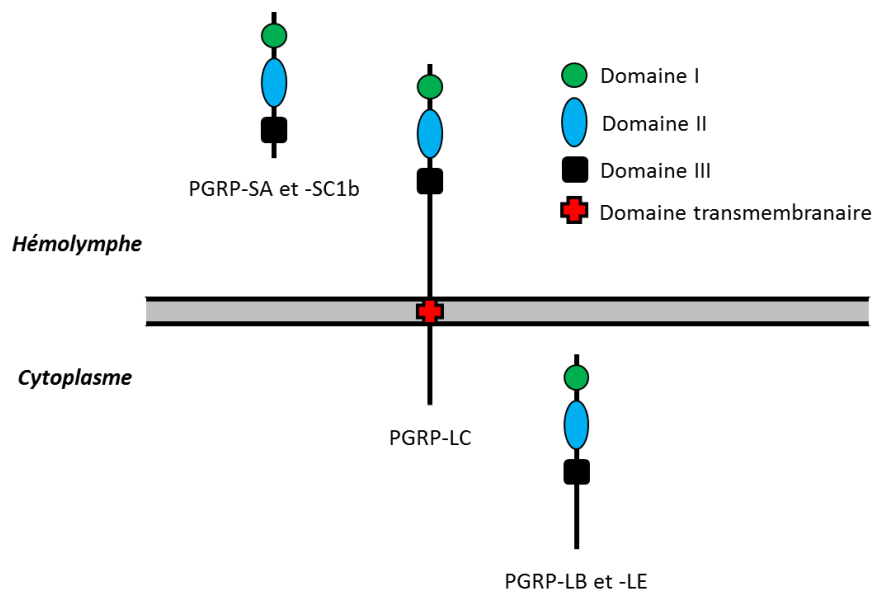
#### **2. 1. 1. Les récepteurs**

La reconnaissance des micro-organismes fait intervenir des récepteurs plasmatiques et cellulaires. Ces récepteurs diffèrent par les motifs qu'ils reconnaissent (peptidoglycane,  $\beta$ -1,3-glucane). Certains des récepteurs présentés ici contribuent directement à l'élimination des pathogènes et peuvent donc être considérés comme des effecteurs. Néanmoins le terme récepteur renvoie ici à l'ensemble des protéines capables de reconnaître et/ou de lier un PAMP.





**Figure 2 : Structure du peptidoglycane bactérien.** La nature du peptidoglycane est définie par l'acide aminé situé en 3<sup>ème</sup> position de la chaîne peptidique (flèche). Le peptidoglycane de type Lysine est présent chez les bactéries Gram positives et le peptidoglycane de type Dap est retrouvé chez les bactéries Gram négatives. (Dziarski, 2004). L'hydrolyse du peptidoglycane par le lysozyme et les PGRP-SC1b et -LB se fait au niveau de la liaison entre le NAM et la chaîne peptidique (Kim et al., 2003; Mellroth et al., 2003).



**Figure 3 : Schéma simplifié des principaux PGRPs d'insectes et de leurs domaines conservés.** Les PGRP-SA et -SC1b sont directement sécrétés dans l'hémolymphe. Le PGRP-SA reconnaît le peptidoglycane des bactéries Gram positives (Lys). Il intervient également dans l'activation de la Pro-phénoloxidase (**fig. 1**). Les PGRP-SC1b et -LB possèdent une activité amidasique et hydrolysent le peptidoglycane. Les PGRP-L possèdent un peptide signal et sont retrouvés au niveau de la membrane plasmique ou du cytoplasme. Les PGRP-LC et -LE activent la voie Imd et favorisent la phagocytose des bactéries Gram négatives. Le PGRP-LE intervient également dans l'activation de la Pro-phénoloxidase (Dziarski, 2004).

### 2. 1. 1. 1. Les PeptidoGlycan Recognition Protein (PGRPs)

Les bactéries Gram positives, comme négatives, possèdent à la surface de leur membrane un composé majeur appelé peptidoglycane (PGN). Il s'agit d'un polymère glucidique formé par l'alternance entre un N-Acétyl-Glucosamine (NAG) et un N-Acétyl-Muramique (NAM) reliés entre eux par des liaisons osidiques de type  $\beta$ -1,4 (**fig. 2**) (Dziarski, 2004). La fonction carboxylique de chaque NAM sert de site de fixation pour une chaîne peptidique de quatre acides aminés. Le type de peptidoglycane est déterminé par la nature du troisième acide aminé de la chaîne peptidique. Le peptidoglycane de type Lysine (Lys) est présent chez les bactéries Gram positives alors que celui de type Diaminopimélique (Dap) est présent chez les bactéries Gram négatives et les bacilles Gram positives. Enfin, deux peptidoglycans peuvent s'assembler par leurs chaînes peptidiques pour former un réseau plus ou moins dense. Le peptidoglycane représente une cible préférentielle pour la reconnaissance des bactéries par le système immunitaire. Cette reconnaissance se fait par une famille de récepteurs appelés PGRPs (PeptidoGlycan Recognition Protein).

Le premier PGRP a été identifié chez le ver à soie *Bombyx mori* (lépidoptère) (Yoshida et al., 1996). Par la suite, l'annotation des génomes de la drosophile et de l'anophèle a permis de mettre en évidence la présence de PGRPs dans différentes espèces (Christophides et al., 2002; Werner et al., 2000). Bien que le nombre de gènes et d'isoformes varie d'une espèce à l'autre, les PGRPs peuvent être classés en fonction de leur taille et de leur localisation. Ainsi on distingue les PGRPs de séquence courte (PGRP-S) ayant une localisation extracellulaire et ceux de séquence longue (PGRP-L) que l'on retrouve au niveau intracellulaire ou transmembranaire (**fig. 3**) (Christophides et al., 2002; Werner et al., 2000). Les PGRP-S sont majoritairement produits par les cellules du corps gras et sont présents dans l'hémolymph. Les PGRP-L, quant à eux, sont surtout produits par les hémocytes.

La région C-terminale des PGRP-S et -L est très conservée et présente une homologie avec le lysozyme du phage T7 (Liu et al., 2001; Werner et al., 2000). Cette région peut être divisée en 3 domaines (I, II et III) dont le rôle n'a pas encore été caractérisé (**fig. 3**). Enfin la région N-terminale est conservée entre les PGRPs mais ne présente aucune homologie avec le lysozyme du phage T7 (Kim et al., 2003). La spécificité de reconnaissance des différents PGRPs pour un type de peptidoglycane donné leur permet de distinguer les bactéries Gram négatives et Gram positives et aide à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptée.

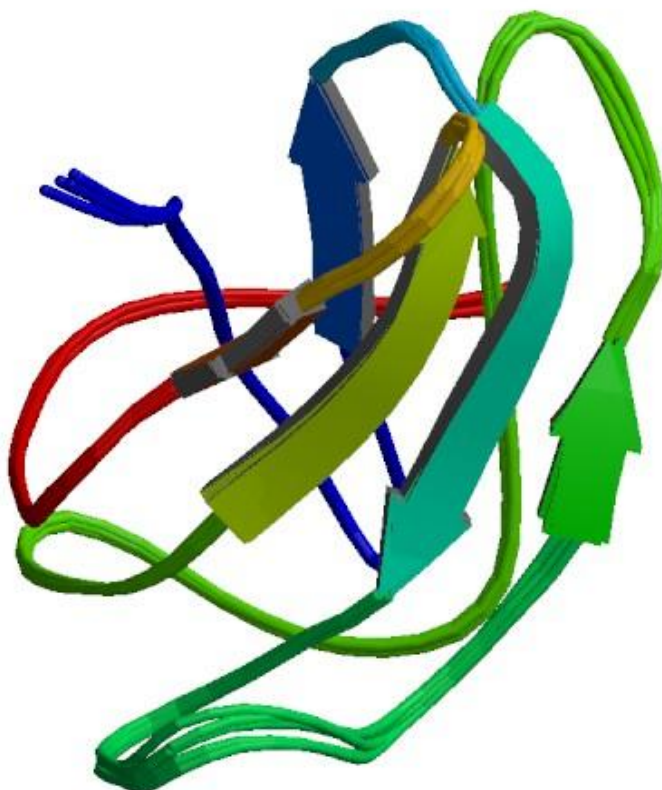
Néanmoins le rôle des PGRPs ne se résume pas seulement à la reconnaissance du peptidoglycane.

Chez la drosophile, il a été montré que l'activation de la voie Toll au cours d'une infection par une bactérie Gram positive nécessitait la présence du PGRP-SA (Michel et al., 2001). Cette activation entraîne alors la production de peptides antimicrobiens tels que la Drosomycine et favorise la survie de la drosophile. Les mécanismes impliqués dans cette activation sont encore inconnus. Toujours chez la drosophile, le PGRP-LC est indispensable pour l'activation de la voie Imd au cours d'une infection par une bactérie Gram négative (Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002). Cette activation entraîne la production de peptides antimicrobiens (**voir paragraphe 2. 1. 2. 1.**) tels que la Diptéricine et la Cécropine et favorise la survie de la drosophile au cours de l'infection. Il a également été montré que le PGRP-LC intervenait dans la reconnaissance et la phagocytose des bactéries Gram négatives (Rämet et al., 2002). Enfin le PGRP-LE a été décrit comme liant le peptidoglycane de type Dap des bactéries Gram négatives et active la voie Imd (Takehana et al., 2002). Le PGRP-LE intervient aussi dans l'activation de la Pro-phénoloxidase, tout comme le PGRP-SA (Yoshida et al., 1996).

Bien que la région C-terminale des PGRPs présente une homologie avec le lysozyme du phage T7 (Kang et al., 1998) seul les PGRP-LB et -SC1b présentent une activité amidasique et sont capables d'hydrolyser le peptidoglycane (Kim et al., 2003; Mellroth et al., 2003).

#### 2. 1. 1. 2. Les $\beta$ GRPs/GNBPs

Les bactéries ne sont pas les seuls micro-organismes capables d'infecter les insectes. Les champignons représentent également un groupe pathogène. La paroi des champignons est composée de deux éléments majeurs que sont la chitine et les  $\beta$ -glucanes. Le  $\beta$ -1,3-glucane est connu pour avoir un effet immuno-stimulateur important chez les vertébrés (Rop et al., 2009). Chez les insectes, la reconnaissance du  $\beta$ -1,3-glucane entraîne également une réponse immunitaire. Cette reconnaissance s'effectue par une famille de récepteurs appelés  $\beta$ GRPs/GNBPs ( $\beta$ -1,3-Glucan Recognition Proteins/Gram-Negative Binding Proteins) (Ochiai and Ashida, 1988; Wang and Wang, 2013).



**Figure 4** : Modélisation de la structure tertiaire du  $\beta$ GRPs/GNBP3 de *Bombyx mori* obtenue par RMN. La structure tertiaire compte 8 brins $\beta$  dont les brins  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 5 et  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ 6,  $\beta$ 7,  $\beta$ 8 forment 2 feuillets  $\beta$  anti-parallèles. La liaison du  $\beta$ -1,3-glucane se fait au niveau N-terminal. La coloration de la séquence va du bleu (N-terminal) vers le rouge (C-terminal) (Takahasi et al., 2009).

Les  $\beta$ GRPs sont des récepteurs plasmatiques produits essentiellement par les hémocytes (Lin et al., 2008). La liaison entre les  $\beta$ GRPs et le  $\beta$ -1,3-glucane entraîne la formation d'un complexe induisant la dégranulation des hémocytes ainsi que l'activation de la Pro-phénoloxidase (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000). Le domaine N-terminal des  $\beta$ GRPs est connu pour lier le  $\beta$ -1,3-glucane alors que le domaine C-terminal est similaire au site catalytique des  $\beta$ -1,3-glucanase même si aucune activité similaire n'a été décrite à ce jour (**fig. 4**) (Pauchet et al., 2009).

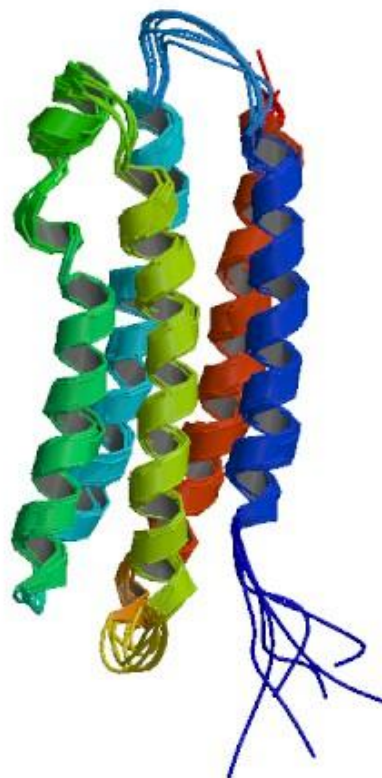
Les GNBPs ont été décrites chez *Bombyx mori* comme liant les bactéries Gram négatives (Lee et al., 1996). Bien que les études faites chez la drosophile semblent confirmer ces résultats, le rôle des GNBPs dans l'immunité n'est pas clairement caractérisé (Kim et al., 2000). Ces récepteurs pourraient intervenir dans des mécanismes immunitaires plus complexes (Wang and Wang, 2013).

### 2. 1. 1. 3. Les transporteurs de lipides

#### Les lipophorines

Chez les insectes, le transport des particules lipidiques de type triacylglycérol (TAG) à travers l'hémolymphe, les muscle et le corps gras est assuré par une famille de protéines appelées lipophorines (Van der Horst et al., 2009). Les lipophorines sont produites par les cellules du corps gras et sont constituées de 2 sous-unités que sont l'Apolipophorine I et II. Dans le cas des particules lipidiques de grande taille, les lipophorines peuvent s'associer avec l'Apolipophorine III (Weers and Ryan, 2006).

Depuis sa découverte il y a près d'un quart de siècle, l'Apolipophorine III suscite un intérêt grandissant. Outre son rôle dans le métabolisme lipidique, cette protéine de 20 kDa est impliquée dans plusieurs processus immunitaires. En effet, les travaux menés sur *Galleria mellonella* indiquent que l'Apolipophorine III agit en récepteur plasmatique capable de reconnaître à la fois le LTA (acide lipotéichoïque) des bactéries Gram positives, le LPS (lipopolysaccharide) des bactéries Gram négatives et le  $\beta$ -1,3-glucane des champignons (Halwani et al., 2000; Pratt and Weers, 2004; Whitten et al., 2004). Cette interaction favorise l'agglutination des pathogènes ainsi que leur phagocytose par les hémocytes.



**Figure 5 : Modélisation de la structure tertiaire de l'Apolipophorine III de *Manduca sexta* obtenue par RMN.**

La structure tertiaire de la protéine compte 6 hélices  $\alpha$  regroupées en un « tonneau » dont le diamètre est modulable en fonction de la taille de la particule lipidique transportée (Wang et al., 2002a).

L'Apolipophorine III intervient également dans l'activation de la réponse humorale en induisant la production de peptides antimicrobiens (Kim et al., 2004). Récemment elle a été décrite chez *Tribolium castaneum* (coléoptère) comme étant impliquée dans l'activation de la Pro-phénoloxidase au cours de la réponse immunitaire à *Bacillus thuringiensis* (Contreras et al., 2013).

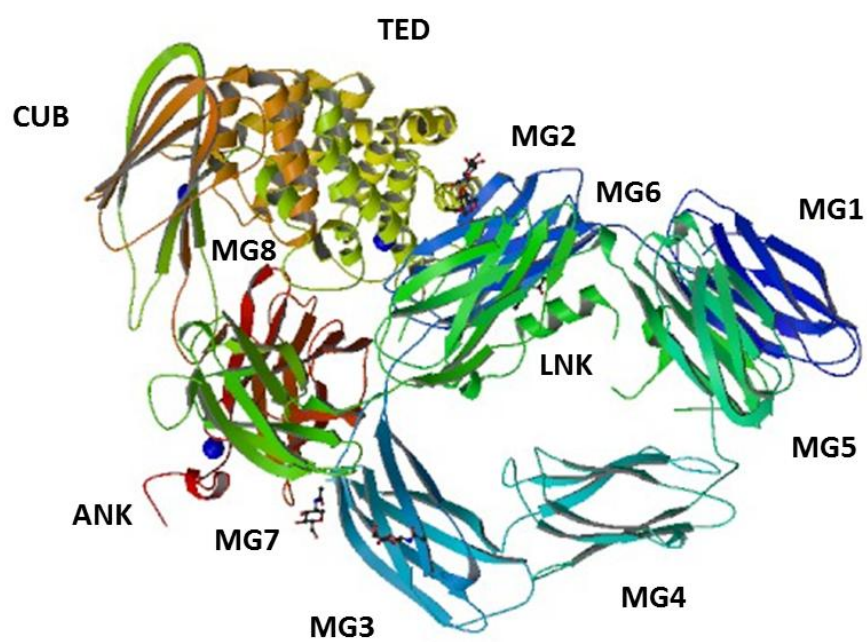
La structure tertiaire de l'Apolipophorine III a été modélisée chez *Manduca sexta* (lépidoptère) et révèle la présence de 6 hélices  $\alpha$  assemblées en « tonneau » (**fig. 5**). Cette conformation semble modulable et permettrait à la protéine de s'adapter à des particules lipidiques de tailles variables (Wang et al., 2002a). De nombreuses études sont en cours afin de caractériser le mode d'action de l'Apolipophorine III.

#### Les Scavenger Receptors (SRs)

Chez les vertébrés, la fixation des lipoprotéines du plasma est assurée par une famille de glycoprotéines trans-membranaires appelées Scavenger Receptor (SRs) (Mukhopadhyay and Gordon, 2004). Ces protéines sont exposées à la surface des macrophages et des cellules endothéliales et musculaires (Pearson, 1996). Toutefois, depuis plus d'une vingtaine d'années, ces récepteurs sont également connus pour jouer un rôle important dans la réponse immunitaire. Ils sont en effet capables de reconnaître une grande variété de pathogènes d'origine bactérienne, fongique, virale ou encore parasitaire et sont impliqués dans le processus de phagocytose (Mukhopadhyay and Gordon, 2004; Pearson, 1996).

Chez les insectes, les Scavenger Receptors sont classés en 3 familles (A, B et C) et sont exprimés par les hémocytes. Les travaux menés sur la drosophile ont permis d'identifier le récepteur Croquemort (classe B), impliqué dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques ainsi que des bactéries Gram positives (Franc et al., 1996; Stuart et al., 2005). Le rôle de récepteur de cette protéine a été confirmé après identification d'un domaine trans-membranaire au niveau N-terminal. Deux autres Scavenger Receptor appartenant à la classe C ont été identifiés chez la drosophile. Les protéines Nimrod et Eater sont impliquées dans la reconnaissance et la phagocytose des bactéries Gram positives et négatives (Kocks et al., 2005; Kurucz et al., 2007). Les résultats d'expériences d'interférence par ARN suggèrent que ces 2 protéines agissent en co-récepteurs avec le PGRP-LC.





**Figure 6:** Modélisation de la structure tertiaire de la protéine TEP1 d'*Anopheles gambiae* obtenue par diffraction aux rayons X. La protéine comporte 2 sous-unités majeures. La sous-unité  $\alpha$  regroupe les domaines CUB, TED, ANK, MG7 et MG-8, riches en hélices  $\alpha$ . La sous-unité  $\beta$ -ring regroupe les domaines LNK, MG1-6, riches en feuillets  $\beta$  (Baxter et al., 2007).



#### 2. 1. 1. 4. Les ThioEster containing Proteins (TEPs)

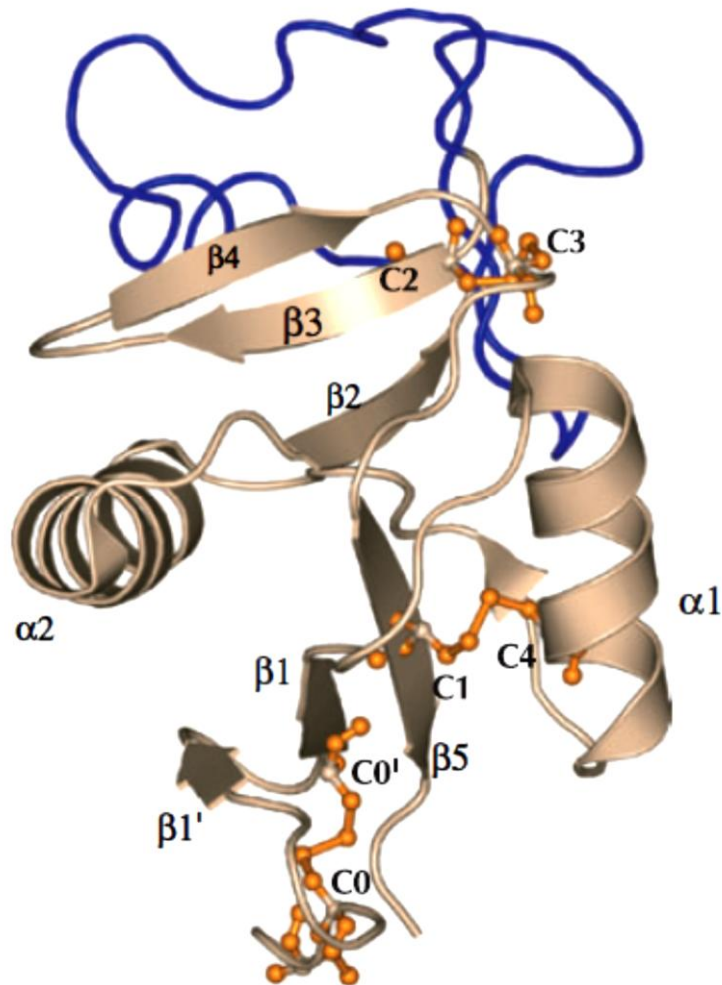
Chez les vertébrés, l'activation du complément représente une voie importante de l'immunité innée, et agit directement dans l'élimination des pathogènes. Il s'agit d'une réaction faisant intervenir de nombreux effecteurs plasmatiques et qui s'achève par la lyse osmotique du micro-organisme (Farries and Atkinson, 1991). Les facteurs C3, C4 et C5 jouent un rôle majeur dans l'activation du complément et appartiennent à la famille des ThioEster containing Proteins (TEPs) (Blandin and Levashina, 2004).

Les TEPs sont également présentes chez les insectes où elles exercent un rôle de récepteur. Au total, 6 TEPs ont été identifiées chez la drosophile et seulement 4 d'entre elles TEP1, TEP2, TEP3 et TEP4 possèdent un domaine thioester (Lagueux et al., 2000). Les TEPs ont un poids moléculaire moyen de 20 kDa et présentent 3 caractéristiques principales, à savoir un domaine thioester conservé au niveau N-terminal, une région riche en cystéine au niveau C-terminal et une région centrale hyper-variable. Les TEPs sont produites par les hémocytes et les cellules du corps gras.

Chez l'anophèle, la protéine TEP1 intervient dans la reconnaissance et la phagocytose des bactéries Gram négatives et l'élimination du parasite *Plasmodium berghei* (**fig. 6**) (Blandin et al., 2004; Levashina et al., 2001). Récemment, les travaux menés chez le moustique *Aedes aegypti* indiquent que les TEPs sont également impliquées dans la réponse antivirale en induisant la production de peptides antimicrobiens tels que la Défensine et la Cécropine (Xiao et al., 2014). Cette activité requiert par ailleurs, la fixation des particules virales par le Scavenger Receptor AaSR-C (*A. aegypti* homologue of scavenger receptor-C).

#### 2. 1. 1. 5. Les Lectines de type C

Les micro-organismes de type virus, bactéries et champignons présentent à leur surface différents hydrates de carbone qui vont être reconnus par des récepteurs plasmatiques appartenant à la famille des lectines de type C. Chez les vertébrés, le rôle des lectines dans la réponse immunitaire innée est clairement décrit, notamment dans l'activation du complément (Fujita et al., 2004).



**Figure 7:** Modélisation de la structure 3D du domaine CRD des lectines de type C humaines obtenue par diffraction aux rayons X. La structure du domaine CRD est formée par 2 boucles entrelacées (bleu et grise). La grande boucle (grise) compte 6 feuillets  $\beta$  et 2 hélices  $\alpha$ . Le feuillet  $\beta 5$  et l'hélice  $\alpha 1$  ainsi que les feuillets  $\beta 3$  et  $\beta 5$  sont liés par un pont disulfure noté C1-C4 et C2-C3. Un troisième pont disulfure spécifique de la grande boucle est également observé (C0-C0') (Zelensky and Gready, 2005).

Le domaine de fixation aux hydrates de carbone, appelé CRD (Carbohydrate Recognition Domain), est formé d'une double boucle comptant 6 feuillets  $\beta$  et 2 hélices  $\alpha$ . L'ensemble est maintenu par 3 ponts disulfures hautement conservés. Le site de fixation aux hydrates de carbones se situe au niveau de la grande boucle (**fig. 7**).

Chez les insectes, les lectines jouent également un rôle important dans la réponse immunitaire. Parmi elles, les lectines de type C sont les mieux caractérisées. Elles sont présentes dans l'hémolymphe à l'état soluble ou bien à la surface des hémocytes (Zelensky and Gready, 2005). Au total, 19 gènes codant les lectines de type C ont été identifiés chez la drosophile (Theopold et al., 1999). Les premiers travaux menés chez différentes espèces de lépidoptères ont montré que des lectines de type C, aussi appelées immulectines, sont capables de fixer le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives et l'acide lipotéichoïque (LTA) des bactéries Gram positives (Koizumi et al., 1999; Yu et al., 2002). D'autres travaux, notamment ceux menés chez la mouche *Sarcophaga peregrina*, révèlent également une augmentation de la concentration en lectines de type C dans l'hémolymphe suite à une blessure et confirment leur rôle dans la réponse immunitaire des insectes (Yu and Kanost, 2000). Les lectines de type C sont également impliquées dans d'autres processus immunitaires importants tels que l'activation de la Pro-phénoloxidase, l'adhésion cellulaire, la phagocytose ou encore la réponse antivirale (Komano et al., 1980; Pace and Baum, 2004; Yu et al., 1999).

#### 2. 1. 1. 6. Les DSCAMs

L'absence d'anticorps chez les invertébrés demeure depuis toujours un argument majeur permettant d'affirmer que seuls les organismes vertébrés possèdent une réponse immunitaire adaptative. Cette réponse adaptative repose sur des régions hyper-variables au sein des domaines immunoglobulines qui composent les anticorps (Huber, 1980; Sela-Culang et al., 2013). Néanmoins, les anticorps ne sont pas les seules protéines à posséder des domaines immunoglobulines. La superfamille des immunoglobulines (IgSF) regroupe plusieurs protéines, dont les DSCAMs (Down Syndrome Cell Adhesion Molecules), ayant un ou plusieurs domaines immunoglobulines (Watson et al., 2005).

Chez la drosophile, 1 gène codant une DSCAM a été identifié (Schmucker et al., 2000). Des expériences d'hybridation *in situ* et de RT-PCR ont montré que ce gène était exprimé au niveau des hémocytes, des cellules du corps gras et du tissu nerveux (Watson et al., 2005). La plupart des DSCAMs ont une localisation trans-membranaire et comporte un domaine extracellulaire impliqué dans la reconnaissance des micro-organismes et un domaine intracellulaire impliqué dans la transduction du signal (Wang and Wang, 2013). La séquence codante comporte 4 clusters d'exon (4, 6, 9 et 17) dont les réarrangements géniques génèrent une hyper-variabilité au niveau du domaine extracellulaire (Watson et al., 2005). Au niveau des hémocytes, les DSCAMs agissent en récepteurs capables de fixer différents composants de la surface des bactéries (LPS et peptidoglycane) et facilitent le processus de phagocytose (Dong et al., 2006). Les motifs reconnus par ces récepteurs restent à déterminer.

#### 2. 1. 1. 7. *Dicer et la voie de l'interférence par ARN*

Les récepteurs précédemment décrits reconnaissent essentiellement les pathogènes de type bactéries et champignons. Les virus représentent également une menace. Chez les insectes, l'étude des mécanismes de défense contre les virus est un domaine de recherche récent. Les travaux menés chez la drosophile ont permis d'identifier un mécanisme majeur de la réponse antivirale appelé interférence par ARN.

Initialement décrit chez la plante et le nématode, l'interférence par ARN intervient dans la régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes mais également dans la réponse antivirale (Fire et al., 1998; Napoli et al., 1990). Chez les insectes, le principal mécanisme impliqué dans la réponse antivirale est celui des siRNA (Kingsolver et al., 2013).

La voie des siRNA intervient dans la réponse à l'infection par un virus à ARN simple brin. Au cours de la réplication virale, des duplex d'ARN vont se former et être pris en charge par la protéine Dicer-2, impliquée dans la reconnaissance et le clivage d'ARN double brin d'origine virale. Le clivage génère des fragments courts (21 nucléotides) d'ARN simple brin, appelés siRNA. Ces siRNA vont ensuite être pris en charge par le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Le complexe RISC/siRNA s'hybride de manière spécifique à tous les ARNs viraux et initie leur dégradation par la protéine Argonaute 2.

### **2. 1. 2. Les effecteurs**

Le terme effecteur renvoie ici à l'ensemble des composés plasmatiques ayant une activité lytique directe sur les pathogènes.

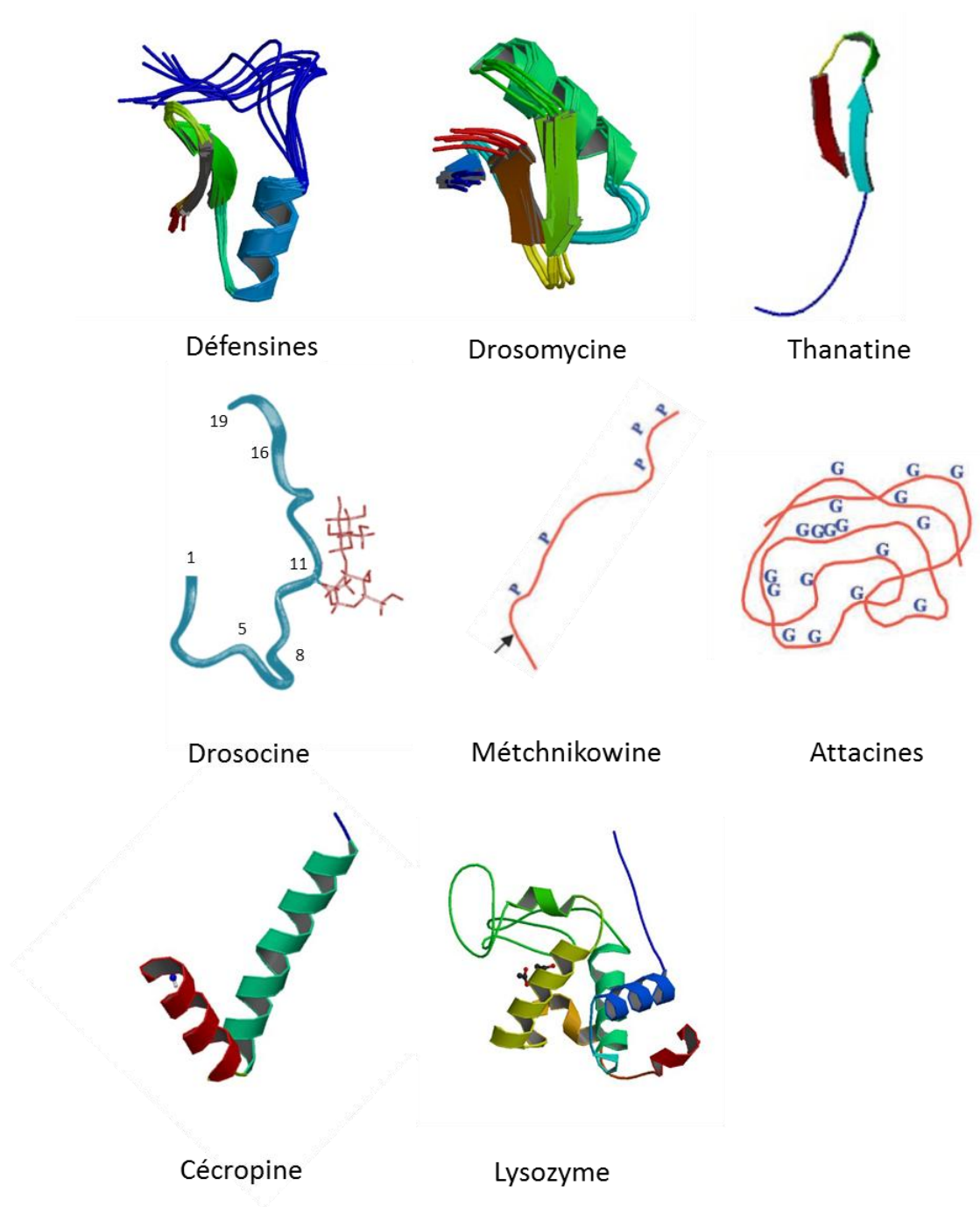
#### **2. 1. 2. 1. Les peptides antimicrobiens**

Les peptides antimicrobiens sont les effecteurs majeurs de la réponse humorale des insectes. Ils sont sécrétés par les cellules du corps gras et dans certains cas par les hémocytes. Le premier de ces peptides, la Cécropine, a été isolé chez le lépidoptère *Hyalophora cecropia* où son activité bactéricide sur les bactéries Gram négatives a été démontrée (Hultmark et al., 1980). Depuis, le nombre de peptides antimicrobiens découvert chez l'insecte n'a cessé d'augmenter. Malgré des spectres d'action différents, ces peptides présentent des similitudes telles que leur faible poids moléculaire compris entre 5 et 20 kDa et leur charge positive. Même si pour certains d'entre eux le mode d'action n'est pas toujours connu, les peptides antimicrobiens peuvent être classés en 3 grandes catégories prenant en compte leur composition en acides aminés.

##### **2. 1. 2. 1. 1. Les peptides antimicrobiens riches en cystéine**

Chez la drosophile, cette catégorie est majoritairement représentée par deux peptides appelés Défensine et Drosomycine.

Les défensines sont présentes chez les diptères (drosophile), les hyménoptères (abeille), les hémiptères (réduve), les coléoptères (scarabée) et les lépidoptères (papillon) et forme une famille de peptides cationiques d'un poids moléculaire moyen de 4 kDa. Elles sont synthétisées sous la forme d'un pré-pro-peptide composé d'une séquence signal et d'un pro-peptide (Dimarcq et al., 1990). La structure tertiaire comporte une hélice  $\alpha$  suivi de 2 feuillets  $\beta$  ( $\beta 1$  et  $\beta 2$ ) antiparallèles (**fig. 8**) (Cornet et al., 1995). La stabilité de la structure tertiaire est assurée par la présence de 6 cystéines formant 3 ponts disulfures entre l'hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta 2$ .



**Figure 8:** Modélisation de la structure tertiaire des différents types d'effecteurs plasmatiques antimicrobiens.

Les défensines, la Drosomycine et la Thanatine sont regroupées dans la famille des peptides riches en cystéine. La Drosocine et la Métchnikowine appartiennent à la famille des peptides riches en proline. La glycosylation sur la Thréonine 11 de la Drosocine est représentée. Les attacines appartiennent à la famille des peptides riches en glycine. La Cécropine appartient à la famille des peptides riches en hélices  $\alpha$ . Le lysozyme forme une famille d'effecteurs plasmatique à part entière. G : glycine ; P : proline.

Les défensines sont majoritairement efficaces contre les bactéries Gram positives telles que *Micrococcus luteus* mais également contre certaines bactéries Gram négatives, levures et champignons (Lee et al., 2004; Lowenberger et al., 1995). Leur pouvoir bactéricide s'explique en partie par leur capacité à créer des pores dans la membrane bactérienne entraînant une perte du contenu cytoplasmique (Cociancich et al., 1993). Une activité similaire a été observée chez le moustique *Aedes aegypti*, dans la réponse anti-parasitaire à *Plasmodium* (Shahabuddin et al., 1998).

La Drosomycine est exclusivement présente chez la drosophile. La structure tertiaire est proche de celle des défensines, avec 1 hélice  $\alpha$  et 3 feuillets  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$ ) (**fig. 8**) (Landon et al., 1997). La stabilité de la structure tertiaire est assurée par la présence 8 cystéines formants 4 ponts disulfures dont 2 relient l'hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta 3$ . L'activité antimicrobienne de la Drosomycine est restreinte aux pathogènes fongiques. Une inhibition de la germination des spores et de l'élongation de l'hyphe, associée à une perte du contenu cytoplasmique a été observée. Néanmoins le mode d'action de la Drosomycine n'est pas connu. C'est également le cas de la Thanatine, isolée chez la punaise *Podisus maculiventris* (hémiptères) et qui appartient également à la famille des peptides antimicrobiens riches en cystéines (Fehlbaum et al., 1996). La structure tertiaire de la Thanatine est cependant très différente de celle des défensines et de la Drosomycine avec seulement 2 feuillets  $\beta$  antiparallèles reliés par un pont disulfure (**fig. 8**). La Thanatine est efficace sur les bactéries Gram positives et négatives et sur les champignons. Ce large spectre révèle un manque de spécificité et rend le mode d'action de ce peptide difficile à comprendre.

#### 2. 1. 2. 1. 2. Les peptides antimicrobiens riches en proline

Il s'agit d'une grande famille de peptides antimicrobiens isolés à partir d'insectes appartenant aux hyménoptères, hémiptères, lépidoptères ou encore diptères. Certains de ces peptides présentent des modifications post-traductionnelles de type O-glycosylation (Bulet et al., 1999). C'est le cas de la Drosocine dont la Thréonine en position 11 est glycosylée par un disaccharide composé d'un N-acétylgalactosamine et d'un galactose (Bulet et al., 1993). Concernant la structure tertiaire, une approche par RMN a montré la présence de 4 courbures majeures positionnées au niveau des résidus 4-7, 10-13, 17 et 18 (**fig. 8**). Il a



également été montré que les résidus 1-5, 17, 18 et 19 étaient importants pour assurer l'activité antibactérienne (McManus et al., 1999). D'autres peptides antimicrobiens glycosylés ont été identifiés chez les hémiptères (pyrrhocoricine), les lépidoptères (lébocines) et les hyménoptères (formaecines) (Cociancich et al., 1994; Hara and Yamakawa, 1995, 1995).

Ces peptides ciblent essentiellement les bactéries Gram négatives en liant le LPS ainsi que la protéine intracellulaire DnaK (Otvos, 2002). Néanmoins le mécanisme lié à l'activité lytique n'a pas été identifié. Il a été montré que la glycosylation au niveau de la Thréonine 11 de la Drosocine entraînait une ouverture de la courbure en position 10-13 qui pourrait permettre d'augmenter l'affinité du peptide pour son ligand (DnaK) (McManus et al., 1999). En effet l'absence de cette glycosylation entraîne une réduction importante de l'activité antibactérienne. Toutefois le délai nécessaire pour l'élimination des bactéries (plusieurs heures) indique que cette activité est beaucoup moins efficace que celles des défensines (quelques minutes). L'hypothèse d'un rôle dans le métabolisme bactérien est à l'étude.

D'autres peptides riches en proline ne présentent pas de modifications post-traductionnelles et peuvent être de petite taille (entre 15 et 20 acides aminés) tels que les apidaecines et les métalnikowines, ou de grande taille (entre 20 et 40 acides aminés) comme les abaecines et les méchnikowines (**fig. 8**). Les apidaecines et les métalnikowines sont surtout actives contre les bactéries Gram négatives en bloquant la synthèse protéique (Bulet et al., 1999). Les abaecines et les lébocines sont actives à la fois contre les bactéries Gram négatives et positives alors que les méchnikowines agissent sur les bactéries Gram positives et sur la croissance des filaments mycéliens (Levashina et al., 1995).

#### *2. 1. 2. 1. 3. Les peptides antimicrobiens riches en glycine*

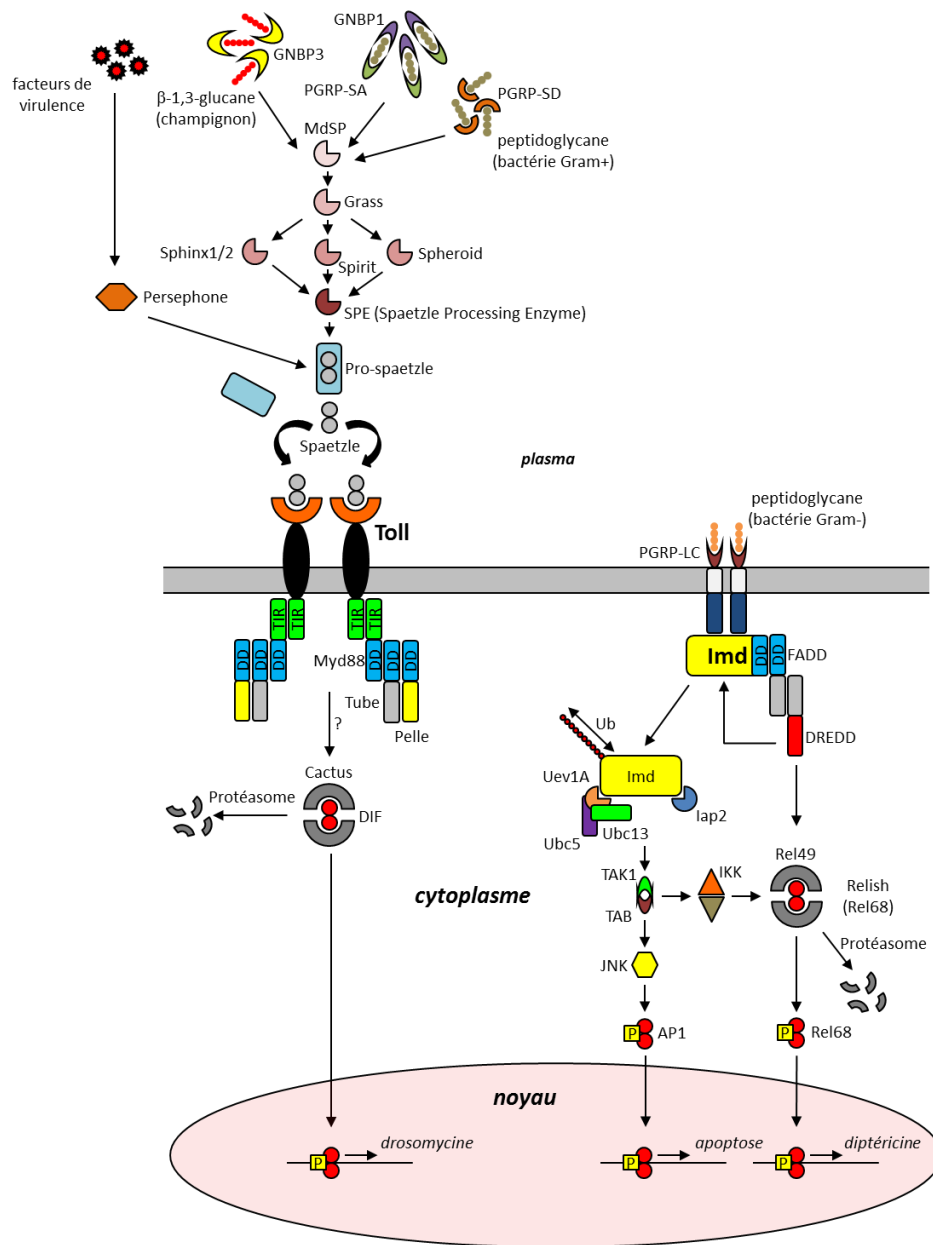
Les peptides antimicrobiens riches en glycine sont présents chez les diptères (diptéricines, attacines et sarcotoxines II), les lépidoptères (attacines), les hyménoptères (hyménoptaecines), les coléoptères (coléoptéricine, holotricine II et III et ténécine III) et les hémiptères (hémiptéricine). Ces peptides ont un poids moléculaire compris entre 8 kDa (holotricine) et 30 kDa (sarcotoxines II) et peuvent être glycosylés (diptéricine). Parmi les peptides riches en glycine, les attacines sont les mieux caractérisés (**fig. 8**). Ces peptides ont



un poids moléculaires moyen de 20 kDa et sont synthétisés sous la forme d'un pré-peptide dont la partie fonctionnelle se situe du côté N-terminal (Hultmark et al., 1983; Sun et al., 1991). La plupart des attacines sont efficaces contre les bactéries Gram négatives. Chez le lépidoptère *Hyalophora cunea*, l'Attacine-B est également efficace contre *Candida albicans* (Kwon et al., 2008). L'activité lytique des attacines repose en partie sur l'inhibition de la synthèse de protéines membranaires essentielles pour la bactérie (OmpC, OmpF, OmpA et LamB) (Carlsson et al., 1991). Les attacines lient également le LPS (Carlsson et al., 1998). Dernièrement, des peptides antimicrobiens riches en glycines ont été identifiés chez les lépidoptères *Hyalophora gloveri* et *Helicoverpa armigera* (Axén et al., 1997; Mackintosh et al., 1998). Ces peptides sont appelés glovérines et ont un poids moléculaires moyen de 14 kDa. Comme les attacines, les glovérines sont synthétisés sous la forme d'un pré-peptide. Néanmoins, ces peptides ne présentent aucune homologie de séquence avec les autres peptides antimicrobiens.

Les glovérines ciblent essentiellement les bactéries Gram négatives et leur activité lytique fait intervenir au moins 3 mécanismes similaires à ceux de l'Attacine : la liaison au LPS, l'inhibition de la synthèse des protéines membranaires et l'augmentation de la perméabilité membranaire (Axén et al., 1997).

De tous les peptides antimicrobiens d'insectes, la Cécropine est le premier à avoir été identifié (Hultmark et al., 1980). La structure tertiaire de ce peptide est formée par 2 hélices  $\alpha$  et n'est retrouvée dans aucune des familles citées précédemment (Holak et al., 1988) (**fig. 8**). Chez les lépidoptères, la Cécropine est active contre les bactéries Gram négatives et positives (Hultmark et al., 1982). Chez les diptères, la Cécropine agit également contre les champignons et le Trypanosome (Boulanger et al., 2002).



**Figure 9: Reconnaissance des micro-organismes et transduction du signal par les voies Toll et Imd.** La voie Toll est activée lors d'une infection par une bactérie Gram positive ou un champignon et aboutie à la production de peptides antimicrobiens tels que la Drosomycine. La voie Imd est activée lors d'une infection par une bactérie Gram négative et entraîne la production de peptides antimicrobiens tels que la Diptéricine. AP-1 : Activator Protein 1 transcription factor ; DD : Death Domain ; DIF : Dorsal-related Immunity Factor ; DREDD : Death-related ced-3/Nedd2-like ; FADD : Fas-Associated Death-Domain-containing protein ; GGBP : Gram-Negative bacteria-Binding Protein ; Grass : Gram-positive-specific serine protease ; lap2 : Inhibitor of apoptosis 2 ; IKK : Inhibitor  $\kappa$ B Kinase ; Imd : Immune Deficiency ; JNK : Jun Kinase ; MdSP : Modular Serine Protease Myd88 : Myeloid Differentiation Factor 88 ; PGRP : Peptidoglycan Recognition Protein ; TAB : TAK1 Binding protein ; TAK1 : Transforming growth factor  $\beta$  Activating Kinase ; TIR : Toll-IL-1R ; Ubc : Ubiquitin-conjugating enzyme ; Uev1A : Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 isoform A.

#### 2. 1. 2. 1. 4. Les voies de régulation des peptides antimicrobiens

Chez la grande majorité des insectes, la production de peptides antimicrobiens lors d'une infection témoigne d'une réponse immunitaire efficace. Ces 15 dernières années, les travaux menés sur la drosophile ont permis d'identifier les mécanismes impliqués dans la régulation de la production des peptides antimicrobiens. Deux grandes voies de signalisation ont ainsi été identifiées. L'activation de chacune de ces voies est un processus complexe et spécifique permettant à l'insecte de mettre en place une réponse immunitaire adaptée au type de pathogène. La voie Toll est activée lors d'une infection par une bactérie Gram positive ou un champignon et régule l'expression de peptides antimicrobiens tels que la Défensine et la Drosomycine. La voie Imd est activée lors d'une infection par une bactérie Gram négative et régule l'expression de peptides antimicrobiens tels que la Diptéricine.

##### La voie Toll

Toll est un récepteur trans-membranaire impliqué dans la fixation de la protéine plasmatique Spaetzle (Weber et al., 2003). La reconnaissance se fait au niveau du domaine extra-cellulaire riche en leucine et la transduction du signal intracellulaire se fait au niveau du domaine TIR (Toll-IL-1R). À la différence des récepteurs précédemment décrits, le ligand du récepteur Toll n'est pas un PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern). Spaetzle est un homodimère de 82 kDa sécrété sous forme de précurseur (Pro-spaetzle) par l'ensemble des cellules de l'organisme (DeLotto and DeLotto, 1998; Weber et al., 2003). Au cours de l'infection, Spaetzle est clivé à la suite d'une cascade protéolytique initiée après la reconnaissance de PAMPs par des récepteurs de type PGRPs et GNBPs (Ferrandon et al., 2004) (**fig. 9**). L'activation de Spaetzle fait intervenir la protéine SPE (Spaetzle Processing Enzyme) (Jang et al., 2006). Cette enzyme est activée par 2 voies différentes. La première nécessite la reconnaissance par la protéine Persephone, de facteurs de virulence d'origine bactérienne ou fongique (El Chamy et al., 2008; Gottar et al., 2006). La seconde fait intervenir les récepteurs de type PGRPs et  $\beta$ GRP/GNBP. Le récepteur GNBP3 reconnaît le  $\beta$ -1,3-glucane fongique tandis que le PGRP-SD et le complexe PGRP-SA/GNBP1 reconnaissent le peptidoglycane de type Lysine des bactéries Gram positives (El Chamy et al., 2008).

La reconnaissance des PAMPs conduit à l'activation de la sérine protéase MdSP (Modular Serine Protease) qui active une seconde sérine protéase appelée Grass (Gram-positive-specific serine protease) (Buchon et al., 2009). L'activation de l'enzyme SPE par la protéine Grass nécessite l'activation des sérines protéases Spirit, Sphéroïde, et Sphinx1/2 (Kambris et al., 2006). Une fois activée, l'enzyme SPE clive la protéine Pro-spaetzle en 2 dimères qui vont chacun se lier à un récepteur Toll.

Au niveau intracellulaire, la dimérisation des récepteurs Toll entraîne le recrutement, via les domaines TIR, de la protéine Myd88 (Myeloid differentiation 88) (Horng and Medzhitov, 2001; Tauszig-Delamasure et al., 2002). Cette protéine va recruter à son tour les protéines Tube et Pelle via leur domaine DD (Death Domain) (Moncrieffe et al., 2008; Sun et al., 2002; Xiao et al., 1999). La formation du complexe Myd88-Tube-Pelle permet, par un mécanisme encore inconnu, la phosphorylation de la protéine Cactus qui va libérer le facteur de transcription DIF (Dorsal-related Immunity Factor) (Towb et al., 2001; Wu and Anderson, 1998). La translocation nucléaire du facteur DIF entraîne l'expression des gènes codant les peptides antimicrobiens tels que la Drosomycine, la Métchnikowine ou encore la Défensine.

### La voie Imd

La voie Imd (Immune-deficiency) est impliquée dans la réponse aux bactéries Gram négatives et régule l'expression des gènes codant les peptides antimicrobiens tels que la Cécropine, la Drosocine et l'Attacine (Hoffmann and Reichhart, 2002). Contrairement à la voie Toll, la voie Imd est directement activée par la reconnaissance du peptidoglycane *via* les récepteurs membranaires de type PGRP-LC (Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002) (**fig. 9**). La protéine Imd est localisée du côté intracellulaire où elle est associée au PGRP-LC et possède également un domaine de mort (DD). Ce domaine de mort permet le recrutement d'une protéine appelée FADD (Fas-Associated Death-Domain-containing protein) qui va elle-même lier la caspase DREDD (Death-related ced-3/Nedd2-like) (Hu and Yang, 2000; Naitza et al., 2002). Les protéines FADD et DREDD, associées à la kinase TAK1, pourraient être impliquées dans l'activation du complexe de type IKK (Hoffmann and Reichhart, 2002). Ce complexe intervient dans la phosphorylation du facteur de transcription Relish. Une fois phosphorylé, Relish va être clivé par DREDD pour pouvoir migrer dans le noyau et activer l'expression des

gènes codant les différents peptides antimicrobiens (Stoven et al., 2003). La voie Imd est impliquée dans des processus cellulaires autres que l'immunité comme l'activation de l'apoptose par la voie JNK (Jun kinase) (Georgel et al., 2001).

La spécificité d'activation des voies Toll et Imd n'est pas toujours en adéquation avec celle des effecteurs produits. En effet, l'activation de la voie Toll lors d'une infection par une bactérie Gram positive ou un champignon, entraîne la production de la Diptéricine, active uniquement sur les bactéries Gram négatives. Cependant, cette réponse aspécifique trouve son intérêt dans l'environnement des insectes où les infections multiples sont fréquentes, notamment lors d'une rupture de la cuticule.

Depuis leur caractérisation, les voies Toll et Imd sont devenues des éléments incontournables de la caractérisation du système immunitaire des insectes. Néanmoins, le séquençage du génome du puceron *Acyrtosiphum pisum* a permis de mettre en évidence l'absence de la majorité des intermédiaires de ces voies et de nombreux gènes codant les peptides antimicrobiens (Gerardo et al., 2010). Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus lors des précédents travaux sur le puceron et replacent les voies Toll et Imd dans un contexte global où de nombreux mécanismes restent à découvrir (Altincicek et al., 2008a).

#### 2. 1. 2. 2. Le Lysozyme

Le lysozyme est un acteur majeur de la réponse humorale. Sa découverte chez l'homme remonte à presque 90 ans, lorsque sa présence en grande concentration dans les larmes des yeux a mis en évidence un fort pouvoir bactéricide permettant de guérir la conjonctivite (Ridley, 1928). Près de 40 ans plus tard, le lysozyme a été isolé chez le lépidoptère *Galleria mellonella* où son activité antimicrobienne a été confirmée (Mohrig W, Messner B., 1968).

Le lysozyme dégrade la paroi des bactéries en hydrolysant le peptidoglycane au niveau de la liaison  $\beta$ -1,4 entre le N-acetylglucosamine et le N-acetylmuramique (**fig. 2 et 8**) (Jollès and Jollès, 1984). Il est produit par les cellules du corps gras et les hémocytes et agit également sur les pathogènes fongiques (Iwona Wojda, 2009).

Le lysozyme intervient également dans la régulation négative de l'activité phénoloxidase (Hultmark D., 1996). En effet, il a été montré chez *Manduca sexta* que le lysozyme pouvait se lier directement à la Pro-phénoloxidase, empêchant ainsi son activation. Le lysozyme induit également la dégradation d'une protéine homologue de serpine (SPH2) et de la proPO-activating proteinase-1 (PAP-1) connues pour jouer un rôle important dans la régulation de l'activation de la Pro-phénoloxidase.

### 2. 1. 2. 3. Les Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS)

Les ROS sont des radicaux libres produits par un groupe d'enzymes appelées NADH oxydase (NOX). Chez l'insecte, les ROS sont impliqués dans des processus très variés comme la synthèse d'hormone et l'apoptose (Rada and Leto, 2008). Depuis un peu plus de 40 ans, les travaux menés sur l'homme ont également mis en évidence la production de ROS par les leukocytes indiquant un rôle dans la réponse immunitaire (Babior et al., 1973). Plus tard, les résultats obtenus chez la drosophile et l'anophèle ont montrés une augmentation de la production de ROS au cours d'une infection bactérienne ou parasitaire (Bahia et al., 2013; Ha et al., 2009).

Le rôle des ROS dans la réponse immunitaire est dû à leur fort pouvoir cytotoxique qu'ils exercent sur les pathogènes (Nappi and Ottaviani, 2000). Néanmoins, les ROS sont également toxiques pour les cellules qui les produisent et nécessitent l'intervention d'enzymes appelées superoxyde dismutase (SOD) et catalase, permettant leur élimination (Bahia et al., 2013).

Malgré sa spécificité et son efficacité, la composante humorale n'est pas la seule à intervenir dans la réponse à l'infection. Les cellules immunitaires appelées hémocytes sont à l'origine de mécanismes défensifs importants et constituent la composante cellulaire du système immunitaire des insectes.

## **2. 2. La réponse cellulaire**

La réponse cellulaire fait intervenir des cellules circulantes appelées hémocytes. Ces hémocytes ont pour rôle la reconnaissance directe ou indirecte des pathogènes et leur élimination *via* différents processus cellulaires.

### **2. 2. 1. Hématopoïèse et hémocytes**

Que ce soit chez la drosophile, l'anophèle ou le ver à soie, les principaux types hémocytaires sont les plasmotocytes, les lamellocytes, les granulocytes et oenocytoïdes. Ces hémocytes sont produits au sein d'un organe hématopoïétique situé au niveau du mésoderme dorsal. Au cours de l'embryogénèse, les premiers hémocytes sont produits au niveau du mésoderme antérieur et colonise l'ensemble des tissus de la larve (Hartenstein and Jan, 1992). Ces hémocytes sont impliqués dans la phagocytose et l'élimination des corps apoptotiques (Franc et al., 1999). À la fin de l'embryogénèse, l'organe hématopoïétique migre vers la nervure dorsale et disparaît peu à peu jusqu'à être totalement absent au stade adulte. Au cours de ce processus, l'organe hématopoïétique libère dans l'hémolymph des cellules non-différenciées appelées pro-hémocytes (Lanot et al., 2001). Les pro-hémocytes vont ensuite se différencier pour former les différents types hémocytaires. Le processus de différenciation cellulaire fait intervenir la voie JAK/STAT et la voie Toll (Qiu et al., 1998; Rawlings et al., 2004). Cette dernière est impliquée dans la prolifération des pro-hémocytes alors que la voie JAK/STAT intervient dans la différenciation cellulaire. Le maintien de la population hémocytaire à l'âge adulte est également régulé par ces 2 voies.

Les plasmotocytes et les granulocytes sont les cellules majoritaires. Elles sont impliquées dans la phagocytose des corps apoptotiques et des pathogènes essentiellement d'origine bactérienne ainsi que dans la nodulation. Les lamellocytes interviennent dans la réaction d'encapsulation (**voir paragraphe 2. 2. 3**). Enfin les oenocytoïdes sont impliqués dans la production et la libération de Pro-phénoloxidase dans l'hémolymph (Lavine and Strand, 2002). Lors de l'infection, la réponse cellulaire fait intervenir l'ensemble des différents types d'hémocytes à travers 3 processus majeurs que sont la phagocytose, l'encapsulation et la nodulation.

### **2. 2. 2. La phagocytose**

Avec les plasmotocytes, les granulocytes sont les seuls hémocytes capables d'adhérer sur lamelle de verre (Lavine and Strand, 2002). Cette capacité d'adhésion, associée aux différents récepteurs présents à la surface de ces hémocytes, intervient dans la phagocytose des pathogènes.

La phagocytose est l'un des mécanismes immunitaires les plus connus au cours duquel le pathogène est internalisé par les cellules, via un réarrangement du cytosquelette d'actine (Aderem and Underhill, 1999). Cette internalisation donne naissance à une vésicule appelée phagosome. Au cours de la phagocytose la concentration en radicaux libres augmente dans le phagosome qui devient le phagolysosome, au sein duquel le pathogène va être éliminé. Malgré son importance dans la réponse cellulaire des insectes, les mécanismes régulant la phagocytose ne sont pas totalement connus. Les travaux menés chez la drosophile et l'anophèle indiquent que la phagocytose n'est pas induite par tous les types de bactéries (Hillyer et al., 2003a; Lamprou et al., 2007). En effet, les bactéries Gram négatives telles que *Escherichia coli* sont d'avantage phagocytées que les bactéries Gram positives telles que *Micrococcus luteus* (Hillyer et al., 2003b).

La résistance à la phagocytose demeure l'un des mécanismes de contournement les plus utilisés par les pathogènes (Smith and May, 2013). Deux stratégies majeures existent. La première consiste à stopper la maturation du phagosome. Ce processus a été décrit chez *Mycobacterium tuberculosis* (Via et al., 1997) et repose sur la séquestration de la protéine Rab5 dont l'exposition à la surface du phagosome est indispensable pour sa maturation. Par ailleurs l'échappement au phagosome a été décrit chez *Shigella flexneri* (Brumell et al., 2002) et fait intervenir des facteurs bactériens (icsB, ipaB et ipaC) qui entraînent la lyse osmotique du phagosome (Allaoui et al., 1992; Page et al., 1999).

### **2. 2. 3. L'encapsulement**

Lorsque le pathogène n'est pas phagocytable, notamment en raison de sa taille (œufs de guêpes endoparasitoïdes, schistosomes...), la réponse cellulaire fait intervenir un processus appelé encapsulation. L'encapsulement est effectuée par les lamellocytes et se



résume par l'adhésion des hémocytes à la surface du pathogène, formant plusieurs couches et aboutissant à une capsule dense (Satyavathi et al., 2014). Le pathogène est éliminé par asphyxie et par la production locale de ROS (Reactive Oxygen Species). Comme pour la phagocytose, les mécanismes moléculaires à l'origine de l'encapsulation restent inconnus.

#### **2. 2. 4. La nodulation**

La nodulation est un processus cellulaire au cours duquel les granulocytes et les plasmotocytes s'agrègent et forment un réseau dense qui immobilise les pathogènes, favorisant leur élimination (Satyavathi et al., 2014). Pour cela, les hémocytes doivent changer de morphologie et adopter un phénotype adhérent. Ce changement est initié lors de la reconnaissance du pathogène par les différents récepteurs membranaires (PGRPs). Les travaux réalisés chez le lépidoptère *Pseudoplusia includens* ont permis d'identifier le PSP (Plasmotocytes-Spreading Peptide) comme étant impliqué dans la nodulation (Clark et al., 1998). En effet, la présence de cette protéine entraîne la formation de nodules aux niveaux des bactéries de façon quasi instantanée. La Pro-phénoloxidase et la protéine Noduler favorisent également la formation de nodules (Cerenius et al., 2008; Gandhe et al., 2007).

La nodulation est donc un processus cellulaire complexe faisant intervenir de nombreux effecteurs plasmatiques. Aussi, son efficacité contre les virus, les bactéries ainsi que les champignons indique que la nodulation est un processus majeur de l'immunité des insectes (Satyavathi et al., 2014).

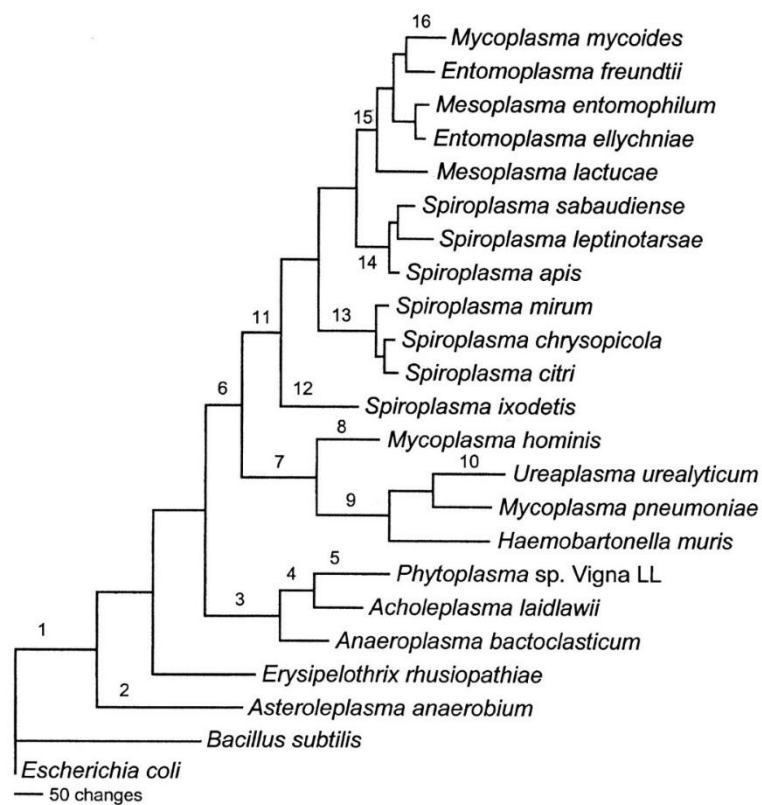
Les micro-organismes pathogènes présents dans l'environnement exercent une pression de sélection forte et constante sur les organismes vertébrés comme invertébrés. En cas d'infection, cette pression se manifeste par des phénomènes de contournement et de résistance face aux réactions de défense de l'organisme. Pour conserver son efficacité, le système immunitaire est donc en constante évolution ce qui entraîne l'apparition de nouveaux mécanismes. Ainsi chez les insectes, les composantes humorale et cellulaire du système immunitaire varient d'une espèce à l'autre. Dans de nombreux cas, cette course à l'adaptation tend vers un équilibre au sein duquel le micro-organisme perd sa pathogénicité, donnant naissance à une relation de type symbiotique.

### III. Les spiroplasmes

#### 1. Historique

La découverte des spiroplasmes remonte à presque 60 ans, lorsque Chana Malogolowkin-Cohen et Donald Frederick Poulson décrivent chez *Drosophila willistoni* un biais de sex-ratio dans la progéniture de certaines femelles (Malogolowkin and Poulson, 1957). L'agent pathogène est alors décrit comme un spirochète présentant une morphologie hélicoïdale (Poulson and Sakaguchi, 1961).

Le terme spiroplasma est utilisé pour la première fois en 1973 par Robert E. Davis et Joseph F. Worley, pour décrire les mollicutes phytopathogènes responsables du « Corn Stunt Disease » et du « Stubborn » des agrumes (Davis and Worley, 1973; Doi et al., 1967; Laflèche and Bové, 1970). Le spiroplasma responsable du « Stubborn », renommé *Spiroplasma citri*, est le premier à être cultivé dans un milieu artificiel (Saglio, 1971; Tully et al., 1973). Quatre ans plus tard, Whitcomb et Williamson parviennent à leur tour à cultiver *in vitro* le spiroplasma responsable du « Corn Stunt Disease » appelé *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb and Williamson, 1975). Rapidement, la nomenclature des spiroplasmes basée sur des critères morphologiques, génétiques et biochimiques permet de regrouper et de renommer plusieurs micro-organismes, dont l'agent responsable du biais de sex-ratio chez la drosophile (*Spiroplasma poulsonii*) et de la cataracte de la souris (*Spiroplasma mirum*). En moins de 10 ans, le nombre de spiroplasmes identifiés ainsi que la diversité des organismes auxquels ils sont associés augmentent considérablement (Clark, 1982). Hormis les plantes, les spiroplasmes sont surtout présents chez les arthropodes et notamment les insectes tels que les Hyménoptères (*Apis mellifera*), les Hémiptères (*Circulifer haematoceps*), les Diptères (*Drosophila melanogaster*) et les Coléoptères (*Tribolium castaneum*). Aujourd'hui, le genre *Spiroplasma* est considéré comme le genre bactérien le plus représenté parmi les symbiontes des arthropodes (Bové, 1997; Kirchhoff et al., 1981; Regassa and Gasparich, 2006; Wang et al., 2011; Williamson et al., 1999).



**Figure 10:** Arbre phylogénétique de la classe des Mollicutes. Les spiroplasmes appartiennent à l'ordre des Entomoplastales comptant 4 clades majeurs : *Mycoides-Entomoplasmataceae*, *Apis*, *Citri-Chrysopicola-Mirum* et *Ixodetis*. *S. citri* appartient au clade *Citri-Chrysopicola-Mirum* (Gasparich et al., 2004).

## **2. Généralités**

Les spiroplasmes sont des bactéries sans paroi appartenant à la classe des Mollicutes. Ils présentent une morphologie hélicoïdale et une importante mobilité (Davis and Worley, 1973). Leur génome est compris entre 780 et 2220 kpb et possède un faible pourcentage en GC caractéristique des organismes appartenant à la classe des Mollicutes (entre 20 et 30 %) (Carle et al., 1995). Ils sont observables en microscopie optique à fond noir et ont une taille comprise entre 100 et 200 nm de diamètre pour 3 à 5 µm de longueur. La définition d'un milieu de culture artificiel complexe a montré que le métabolisme des spiroplasmes était limité. En effet, ils ne sont pas capables de synthétiser, entre autres, les stérols (Saglio et al., 1973) et les acides gras indispensables à leur croissance (Freeman et al., 1976; Mudd et al., 1977; Saglio et al., 1973). Néanmoins les spiroplasmes phytopathogènes, *S. citri* (Saglio, 1971), *S. kunkelii* (Liao, 1977) et *S. phoeniceum* (Saillard, 1987) ont pu être cultivés *in vitro*. Le milieu de culture est essentiellement composé d'acides gras, de stérols, de tous les acides aminés et de sucrose.

La majorité des spiroplasmes sont de nature commensale ou symbiotique et sont associés à de nombreux organismes, animaux comme végétaux, chez qui la présence de stérols et d'acides gras leur permet de se multiplier. La capacité des spiroplasmes à occuper des niches écologiques diversifiées dépend majoritairement de leur mode de transmission. En effet les spiroplasmes, pathogènes comme non-pathogènes sont essentiellement transmis de manière horizontale (salive et matières fécales) ce qui favorise leur dissémination (Gasparich, 2010). Il a également été montré que les spiroplasmes phytopathogènes étaient transmis à la plante par l'intermédiaire d'un insecte vecteur. Ces spiroplasmes sont donc associés à la fois à la plante et à l'insecte. D'autres, tels que *S. poulsonii* (pathogène de drosophile), sont transmis verticalement (Williamson et al., 1999).

**Tableau 1: Tableau des différents groupes de spiroplasmes et des organismes auxquels ils sont associés.**

Espèces	Souches	Groupes	Hôtes
<i>Spiroplasma citri</i>	Maroc-R8A2 <sup>T</sup>	I-1	Phloème, Cicadellidae
<i>Spiroplasma melliferum</i>	BC-3 <sup>T</sup>	I-2	Abeille
<i>Spiroplasma kunkelii</i>	E275 <sup>T</sup>	I-3	Phloème/Cicadellidae
<i>Spiroplasma sp.</i>	277F	I-4	Ixodidae
<i>Spiroplasma sp.</i>	LB-12	I-5	Miridae
<i>Spiroplasma insolitum</i>	M55 <sup>T</sup>	I-6	Fleur
<i>Spiroplasma sp.</i>	N525	I-7	Miridae
<i>Spiroplasma phoeniceum</i>	P40 <sup>T</sup>	I-8	Phloème/Cicadellidae
<i>Spiroplasma penaei</i>	SHRIMP <sup>T</sup>	I-9	Ecrevisse
<i>Spiroplasma poulsonii</i>	DW-1 <sup>T</sup>	II	Drosophile
<i>Spiroplasma floricola</i>	OMBG	III	Fleur
<i>Spiroplasma apis</i>	B31 <sup>T</sup>	IV	Abeille
<i>Spiroplasma mirum</i>	SMCA <sup>T</sup>	V	Ixodidae
<i>Spiroplasma ixodetis</i>	Y32 <sup>T</sup>	VI	Ixodidae
<i>Spiroplasma monobiae</i>	MQ-1 <sup>T</sup>	VII	Guêpe
<i>Spiroplasma syrphidicola</i>	EA-1 <sup>T</sup>	VIII-1	Syrphidae
<i>Spiroplasma sp.</i>	TAAS-1	VIII-3	Taon
<i>Spiroplasma chrysopicola</i>	DF-1 <sup>T</sup>	VIII-2	Taon
<i>Spiroplasma clarkii</i>	CN-5 <sup>T</sup>	IX	Ixodidae
<i>Spiroplasma culicicola</i>	AES-1 <sup>T</sup>	X	Moustique
<i>Spiroplasma velocicrescens</i>	MQ-4 <sup>T</sup>	XI	Guêpe
<i>Spiroplasma diabroticae</i>	DU-1 <sup>T</sup>	XII	Scarabée
<i>Spiroplasma sabaudiense</i>	Ar-1343 <sup>T</sup>	XIII	Moustique
<i>Spiroplasma corruscae</i>	EC-1 <sup>T</sup>	XIV	Taon/Scarabée
<i>Spiroplasma sp.</i>	I-25	XV	Cicadellidae
<i>Spiroplasma cantharicola</i>	CC-1 <sup>T</sup>	XVI-1	Scarabée
<i>Spiroplasma sp.</i>	CB-1	XVI-2	Scarabée
<i>Spiroplasma sp.</i>	Ar-1357	XVI-3	Moustique
<i>Spiroplasma turnicum</i>	Tab 4c	XVII	Taon
<i>Spiroplasma litorale</i>	TN-1 <sup>T</sup>	XVIII	Taon
<i>Spiroplasma lampyridicola</i>	PUP-1 <sup>T</sup>	XIX	Luciole
<i>Spiroplasma leptinotarsae</i>	LD-1 <sup>T</sup>	XX	Scarabée
<i>Spiroplasma sp.</i>	W115	XXI	Fleur
<i>Spiroplasma taiwanense</i>	CT-1 <sup>T</sup>	XXII	Moustique
<i>Spiroplasma gladiatoris</i>	TG-1 <sup>T</sup>	XXIII	Mouche
<i>Spiroplasma chinense</i>	CCH <sup>T</sup>	XXIV	Fleur
<i>Spiroplasma diminutum</i>	CUAS-1 <sup>T</sup>	XXV	Moustique
<i>Spiroplasma alleghenense</i>	PLHS-1 <sup>T</sup>	XXVI	Panorpidae
<i>Spiroplasma lineolae</i>	TALS-2 <sup>T</sup>	XXVII	Taon
<i>Spiroplasma platyhelix</i>	PALS-1 <sup>T</sup>	XXVIII	Libellule
<i>Spiroplasma sp.</i>	TIUS-1	XXIX	Guêpe
<i>Spiroplasma sp.</i>	BIUS-1	XXX	Fleur
<i>Spiroplasma montanense</i>	HYOS-1 <sup>T</sup>	XXXI	Taon
<i>Spiroplasma helicoides</i>	TABS-2 <sup>T</sup>	XXXII	Taon
<i>Spiroplasma tabanidicola</i>	TAUS-1 <sup>T</sup>	XXXIII	Taon
<i>Spiroplasma sp.</i>	BARC 1901	XXXIV	Taon
<i>Spiroplasma sp.</i>	BARC 4886	XXXV	Taon
<i>Spiroplasma sp.</i>	BARC 4900	XXXVI	Taon
<i>Spiroplasma sp.</i>	BARC 4908	XXXVII	Taon
<i>Spiroplasma sp.</i>	GSU5450	XXXVIII	Taon
<i>Spiroplasma atrichopogonis</i>	GNAT3597 <sup>T</sup>	Nd	Ceratopogonidae
<i>Spiroplasma leucomae</i>	SMA <sup>T</sup>	Nd	Lymantriidae

### **3. Classification et phylogénie**

Les spiroplasmes appartiennent à la famille des *Spiroplasmataceae* (Ordre des Entomoplasmatales, Classe des Mollicutes). L'ordre des *Entomoplasmatales* compte 4 clades majeurs : les *Mycooides-Entomoplasmataceae*, les *Apis*, *Citri-Chrysopicola-Mirum* et les *Ixodetis* (**fig. 10**). Le clade *Citri-Chrysopicola-Mirum* comprend notamment les espèces *S. citri*, *S. poulsonii*, *S. phoeniceum*, *S. kunkelii*, *S. melliferum* et *S. penaei* (Gasparich et al., 2004).

Les spiroplasmes sont classés dans 38 groupes sur la base de critères essentiellement sérologiques (inhibition de croissance par sérum immun de lapin et test de déformation des spiroplasmes), génomiques (hybridation d'ADN génomique, ARN 16S) et métaboliques (hydrolyse de l'arginine) (Brown et al., 2007). Parmi les 38 groupes identifiés, *S. citri* appartient au groupe I-1 (**tab. 1**).

### **4. Hôte, transmission et pathogénicité**

#### **4. 1. Interaction spiroplasmes/plantes**

Bien que la majorité soit associée aux arthropodes, les premiers spiroplasmes qui ont été caractérisés sont phytopathogènes. Ces spiroplasmes sont exclusivement retrouvés dans les tubes criblés de la plante, au niveau des vaisseaux du phloème dans lesquels circule la sève élaborée (Doi et al., 1967).

*Spiroplasma citri* (groupe I-1) est l'agent responsable du «Stubborn» des agrumes (Saglio et al., 1973). Cette maladie est à l'origine de perturbations dans le développement de la plante entraînant le jaunissement et la chlorose des feuilles, la prolifération des bourgeons axillaires en balais de sorcière, la réduction de la taille de l'arbre et la diminution de la taille du fruit causant des pertes de rendement (Laflèche and Bové, 1970) (**fig. 11**). Les agrumes ne sont pas les seules plantes à être infectées par *S. citri*. Des symptômes liés à l'infection par ce spiroplasme ont été observés chez différentes espèces de Brassicacées (brocoli, radis, giroflée), Fabacées (trèfle, pois), d'Astéracées (chrysanthème) et d'Apiaceae (carotte) (Mello et al., 2009; Whitcomb, 1979).



**Figure 11:** Citrus atteint de la maladie du « Stubby ». La flèche montre une réduction importante de la taille de l'arbre, caractéristique d'une infection par *Spiroplasma citri*. Image (<http://www.fao.org>)



**Figure 12:** Plant de maïs atteint de la maladie du « Corn Stunt Disease ». Les flèches montrent le rougissement des feuilles caractéristique d'une l'infection par *Spiroplasma kunkelii* (Fletcher and Wayadanda, 2002).



Les symptômes causés par *S. citri* diffèrent d'une espèce à l'autre et semblent être associés à des perturbations dans la répartition du fructose et du glucose dans la plante. La caractérisation des mutants obtenus par insertion du transposon *Tn4001* a montré que l'apparition des symptômes chez la plante infectée était associée à l'utilisation du fructose par les spiroplasmes (Gaurivaud et al., 2000). En effet, le catabolisme du fructose entraîne d'une part une acidification au niveau du phloème et, d'autre part, une mauvaise répartition des sucres entre les organes sources (feuilles matures) et les organes puits (racines et jeunes feuilles) dans la plante (Lerchl et al., 1995). Hormis le catabolisme du fructose, aucun facteur de virulence n'a encore été identifié chez *S. citri*.

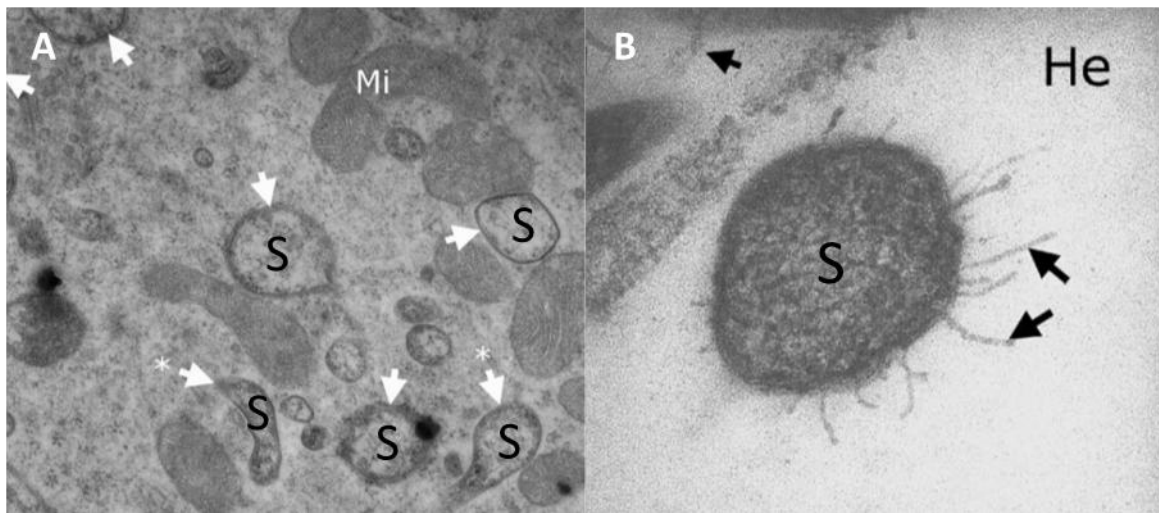
*S. kunkelii* (groupe I-3) est l'agent responsable du « Corn Stunt Disease » dont les symptômes sont une chlorose et un rougissement des feuilles ainsi qu'un raccourcissement des entrenœuds donnant à la plante un aspect rabougris et touffu (Tully et al., 1973) (**fig. 12**). Néanmoins aucun facteur de virulence n'a été identifié permettant d'expliquer la pathogénicité de ce spiroplasma.

Le dernier des spiroplasmes phytopathogènes cultivés est *S. phoeniceum* (groupe I-8). Ce spiroplasma a été isolé à partir de pervenches de Madagascar *Catharanthus roseus* présentant un jaunissement des feuilles, symptômes similaires à ceux observés lors d'une infection par *S. citri* (Saillard, 1987). Tout comme *S. kunkelii*, aucun facteur lié à la pathogénicité n'a été identifié chez *S. phoeniceum*.

#### **4. 2. Interaction spiroplasmes/insectes**

Les principaux insectes infectés par les spiroplasmes sont les Hyménoptères, les Coléoptères, les Lépidoptères, les Diptères et les Hémiptères. Il ne s'agit pas ici de faire l'inventaire des spiroplasmes d'insectes mais plutôt de présenter les connaissances sur les mécanismes liés à la transmission et la pathogénicité des spiroplasmes chez les insectes. L'interaction entre *S. citri* et *Circulifer haematoceps* sera traité plus en détail dans le paragraphe 4. 4.





**Figure 13:** Observation en microscopie électronique de *S. kunkelii* au cours de son cycle dans *D. maidis*. (A) Passage de la barrière intestinale par endocytose. Les flèches blanches montrent des vésicules d'endocytose contenant des spiropasmes. (B) Structures de type pili et fimbriae à la surface de la bactérie. Les flèches noires montrent des prolongements membranaires ressemblant à des pili. He : hémolymphe ; Mi : mitochondrie ; S : spiropasmes. (Ozbek et al., 2003)

*S. kunkelii* est transmis de manière horizontale par la cicadelle *Dalbulus maidis* (Markham, 1983). Après acquisition sur une plante infectée, les spiroplasmes effectuent un cycle circulant-multipliant-persistant (**voir paragraphe 4. 4**). Les observations en microscopie électronique à transmission ont montré que *S. kunkelii* traversait la barrière intestinale par un processus d'endocytose-exocytose pour se retrouver dans l'hémolymph et s'y multiplier (**fig. 13A**) (Ozbek et al., 2003). Des structures apparentées à des pili et des fimbriae semblent intervenir dans le passage de la barrière intestinale (**fig. 13B**). Toutefois, aucune étude biochimique ou moléculaire n'a permis de vérifier cette hypothèse. Les spiroplasmes infectent également les tubes de Malpighi et les cellules musculaires. La présence de nombreux spiroplasmes dans les cellules musculaires nécrotiques suggère que *S. kunkelii* est pathogène pour son insecte vecteur.

*S. poulsonii* (groupe II) est le premier spiroplasma identifié chez les insectes (Malogolowkin and Poulson, 1957). Sa première mise en culture date de 1986, soit 25 ans après celle de *S. citri* (Hackett et al., 1986). *S. poulsonii* est pathogène pour son hôte : il est l'agent responsable du biais de sex-ratio (élimination des progénitures mâles) chez *Drosophila willistoni* (Williamson et al., 1999). Son mode de transmission verticale (ou trans-ovarienne) le distingue des spiroplasmes phytopathogènes.

La transmission trans-ovarienne de *S. poulsonii* fait intervenir les protéines « Yolk » (Vitellogénine) (Herren et al., 2013). Ces protéines sont produites par les cellules du corps gras et sont impliquées dans le transport de lipides dans l'hémolymph. Au niveau des ovocytes, les complexes « Yolk-lipides » se fixent au récepteurs Yolkless et sont endocytés (Li et al., 2008). Les observations réalisées chez la drosophile ont montré que *S. poulsonii* se liait aux protéines Yolk et utilisait l'endocytose de ces protéines pour coloniser les ovocytes. D'autre part, les observations menées chez la femelle ont aussi montré que *S. poulsonii* était majoritairement présent dans l'hémolymph ainsi que dans le tissu nerveux, le tissu musculaire et le corps gras (Kuroda et al., 1992; Sakaguchi and Poulson, 1961). Chez les rares mâles qui survivent au biais de sex-ratio, *S. poulsonii* a été retrouvé dans l'hémolymph mais en quantité réduite (Sakaguchi and Poulson, 1961).

L'élimination de la progéniture mâle est due à une mortalité cellulaire observée dans l'ensemble de l'organisme et une malformation du système nerveux (GregoryDD Hurst et al., 2003; Hurst and Jiggins, 2000). La mortalité cellulaire touche préférentiellement les tissus épithéliaux et fait intervenir la voie apoptotique (Harumoto et al., 2014). De plus, les résultats montrent que la gravité des symptômes n'est pas corrélée à la multiplication de *S. poulsonii* dans l'insecte et suggèrent la production de facteurs de virulence par ce spiroplasma. À ce jour, aucun de ces facteurs n'a été identifié.

D'autres spiroplasmes pathogènes d'insectes sont connus. Chez l'abeille *Apis mellifera*, deux spiroplasmes ont été identifiés. Le premier, *S. apis* (groupe IV), a été décrit comme étant l'agent responsable de la maladie de Mai (May Disease), caractérisée par une forte mortalité à proximité de la ruche (Mouches et al., 1983). Le second, *S. melliferum* (groupe I-2) a également été décrit comme entraînant une réduction significative de la longévité (Clark et al., 1985). Toutefois pour ces deux spiroplasmes, aucune donnée expérimentale n'est disponible. Le mode de transmission ainsi que les tissus infectés sont inconnus. Néanmoins, les tremblements qui ont été observés chez les abeilles infectées suggèrent que le tissu nerveux est atteint.

#### **4. 3. Interaction spiroplasmes/crustacés**

Actuellement, 3 espèces de spiroplasmes pathogènes ont été identifiées. Le premier de ces spiroplasmes, *S. eriocheiris* (groupe XLIII), a été isolé chez le crabe *Eriocheir sinensis* (Wang et al., 2003, 2004a, 2011). Les 2 autres, *S. penaei* (groupe I-9) et *Spiroplasma* sp. MR-1008 (groupe V), ont été identifiés respectivement chez les crevettes *Penaeus vannamei* (Nunan et al., 2005) et *Macrobrachium rosenbergii* (Liang et al., 2011a).

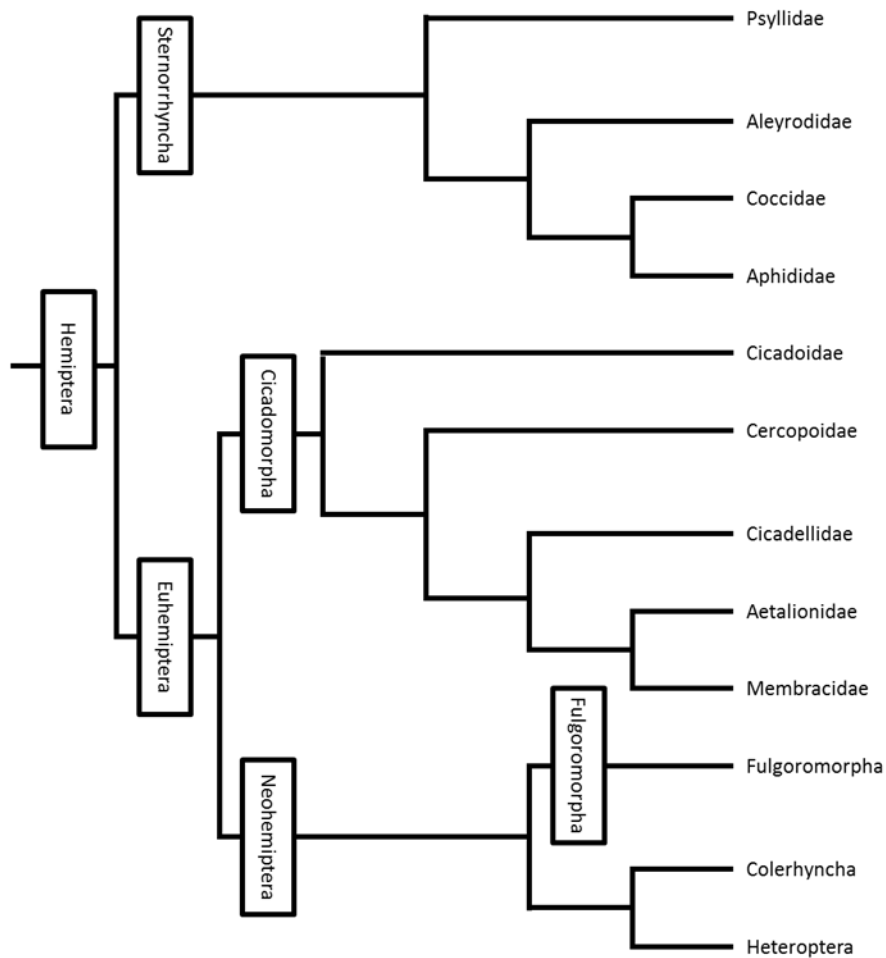
À ce jour, le mode de transmission de *S. penaei* n'est pas connu. Toutefois, il a été montré que la mouche de l'eau *Aquarius paludum* était infectée par *S. penaei* (Altamiranda M and Briñez R, 2011). Bien que cette mouche partage la même niche écologique que la crevette *Penaeus vannamei*, aucune transmission n'a encore été décrite. L'hypothèse d'une transmission horizontale par cet insecte reste cependant à l'étude (Gasparich, 2010).

Chez *Penaeus vannamei*, l'injection d'hémolymph issue d'individus infectés par *S. penaei* dans des individus sains entraîne une mortalité comprise entre 20 et 70% (Nunan et al., 2005) et l'injection d'une culture pure de *S. penaei* entraîne 100% de mortalité en 2 jours (Nunan et al., 2004). *S. penaei* infecte les cellules de l'hépatopancréas (organe de l'appareil digestif présent chez les arthropodes et les mollusques), le tube nerveux ventral, le muscle squelettique et les hémocytes (Krol et al., 1991; Nunan et al., 2004).

*S. eriocheiris* est l'agent responsable du « tremor disease » chez le crabe *Eriocheir sinensis*. Cette maladie se caractérise par des tremblements importants (tremor) associés à une forte mortalité pouvant atteindre 90% de la population infectée (Wang et al., 2011). Tout comme *S. penaei*, les mécanismes liés à cette mortalité ne sont pas connus. Ce spiroplasma infecte les hémocytes et le tissu nerveux (Wang et al., 2002b).

*S. eriocheiris* est le seul spiroplasma de crustacés dont le mode de transmission a été identifié. Après 30 jours d'incubation en présence de crabes infectés, des symptômes associés à la présence de *S. eriocheiris* ont été observés chez des crabes initialement sains indiquant que ce spiroplasma est transmis de manière horizontale (Wang et al., 2002b).

*Spiroplasma sp.* MR-1008 est le dernier spiroplasma identifié chez les crustacés. L'injection de *Spiroplasma sp.* MR-1008 entraîne une mortalité de 80% en 20 jours chez la crevette *Macrobrachium rosenbergii* (Liang et al., 2011b). Tout comme *S. eriocheiris* et *S. penaei*, ce spiroplasma infecte essentiellement les hémocytes. Bien que les mécanismes impliqués dans la pathogénicité ne soient pas connus, il a été montré que l'infection par *Spiroplasma sp.* MR-1008 entraînait une forte mortalité des hémocytes.



**Figure 14:** Phylogénie de l'ordre des Hémiptères basée sur les études de phylogénie moléculaire. (Campbell et al., 1995)



**Figure 15:** Photographies des insectes vecteurs de *S. citri*. *C. tenellus* (à gauche) est le vecteur majoritaire de *S. citri* en Californie alors que *C. haematoceps* (à droite) est le vecteur principal dans les pays du pourtour méditerranéen.

#### **4. 4. Le modèle *S. citri*/Circulifer haematoceps**

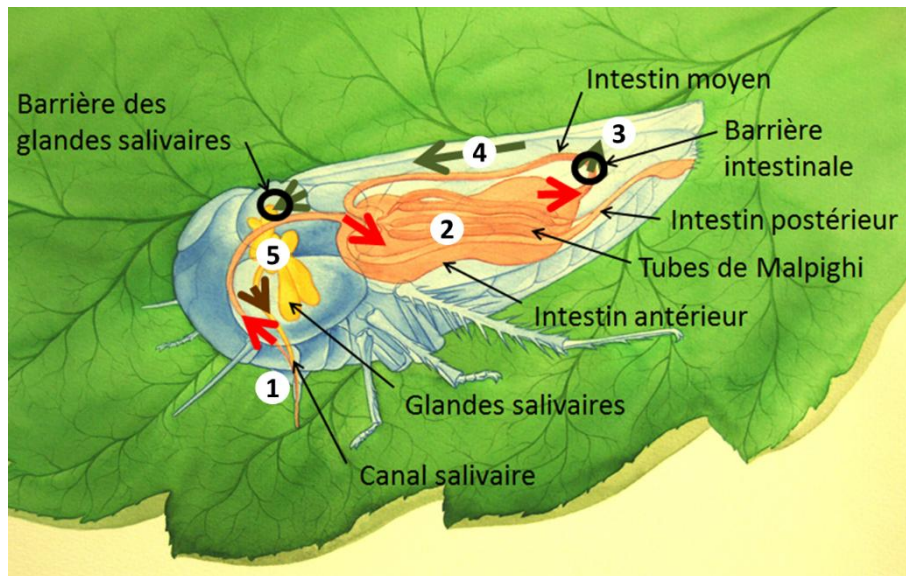
*S. citri* est l'agent phytopathogène responsable de la maladie du « Stubborn » des agrumes (**voir paragraphe 4. 1**). Cette maladie a surtout été observée en Californie (Etats-Unis) et dans les pays du pourtour méditerranéen. Pour chacune des zones géographiques infestées, les insectes vecteurs de *S. citri* ont été recherchés. Au total 6 espèces appartenant toutes à la famille des cicadelles ont été identifiées : *Circulifer haematoceps*, *Circulifer tenellus*, *Scaphytopius nitridus*, *Scaphytopius acutus delongi*, *Scaphytopius californiensis* et *Macrosteles fascifrons* (Bové, 1986; Bové, J.M et al., 1979; Fos et al., 1986; Golino and Oldfield, 1990; Klein et al., 1988).

Les cicadelles sont des insectes piqueur/suceur de sève élaborée appartenant à l'ordre des Hémiptères (**fig. 14**). Après éclosion, l'embryogénèse s'étale sur 5 stades larvaires (L1-L5). À 30°C, la durée moyenne de chaque stade est d'une semaine et la durée de vie d'une cicadelle au stade adulte est comprise entre 1 et 2 mois. *C. tenellus* et *C. haematoceps* sont considérés comme étant respectivement les vecteurs principaux de *S. citri* en Californie et dans les pays du pourtour méditerranéen (**fig. 15**). La souche GII3 de *S. citri* utilisée au laboratoire a été isolée au Maroc à partir de *C. haematoceps* (Vignault J. C., 1980a). De fait les expériences de transmission sont réalisées avec cette cicadelle. Au laboratoire, *C. haematoceps* est élevée sur giroflées (*Matthiola incana*).

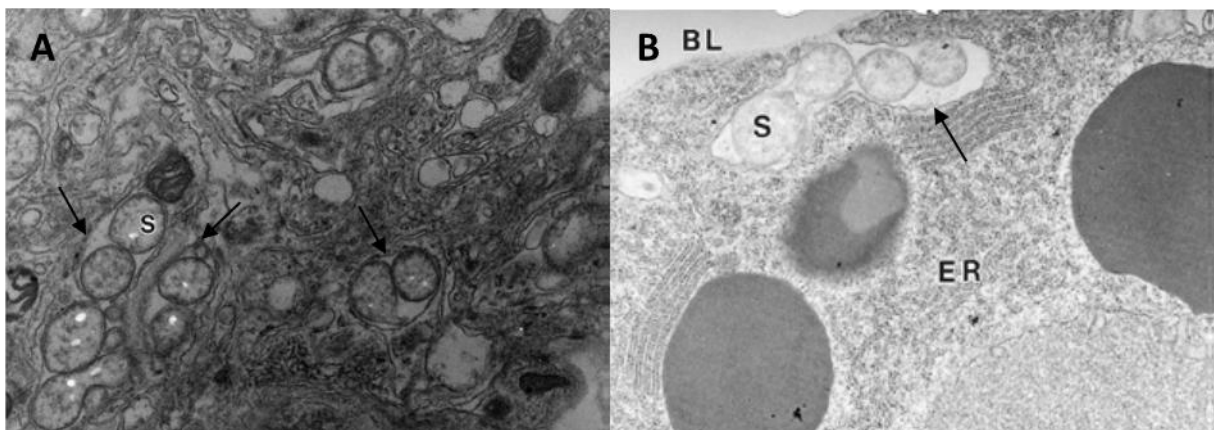
L'efficacité de la transmission de *S. citri* par *C. haematoceps* repose essentiellement sur la capacité des spiroplasmes à se maintenir dans l'insecte. L'infection par *S. citri* suit un cycle circulant-multipliant-persistant : circulant car les spiroplasmes effectuent un cycle complet dans l'insecte allant de la lumière intestinale jusqu'au canal salivaire en passant par l'hémolymph avant d'être transmis à la plante; multipliant car les spiroplasmes se multiplient dans l'hémolymph de l'insecte ; persistant car les spiroplasmes se maintiennent jusqu'à la mort de l'insecte (**fig. 16**).

Après avoir été ingérés par l'insecte, les spiroplasmes se retrouvent au niveau de la lumière intestinale. Ils interagissent alors étroitement avec la membrane du pôle apical des cellules épithéliales de l'intestin moyen et entrent dans ces cellules par endocytose (Kwon et al., 1999a; Liu, 1983). Au niveau des vésicules d'endocytose, les spiroplasmes perdent leur morphologie hélicoïdale (**fig. 17A**).





**Figure 16:** Cycle circulant-multipliant-persistant de *S. citri* dans son insecte vecteur *C. haematoceps*. Les spiroplasmes sont ingérés à travers le stylet (1), se retrouvent dans l'intestin antérieur (2) et migrent vers l'intestin moyen (3) où ils sont internalisés. Une fois dans l'hémolymphe (4), les spiroplasmes se multiplient et migrent vers les glandes salivaires (5) qu'ils colonisent avant d'être transmis à la plante lors d'un repas. Le passage de la barrière intestinale et des glandes salivaires se fait par un mécanisme d'endocytose-exocytose faisant intervenir des interactions protéiques essentiellement de type lectine.



**Figure 17:** Observation en microscopie électronique à transmission de *S. citri* au cours de son cycle chez *C. tenellus*. (A) Passage de la barrière intestinale et (B) des glandes salivaires par endocytose-exocytose. Les flèches montrent des vésicules d'endocytose contenant plusieurs spiroplasmes de forme sphérique. BL : lame basale ; ER : réticulum endoplasmique ; S : spiroplasmes. (Kwon et al., 1999)

Après avoir franchi la barrière intestinale, les spiroplasmes se retrouvent dans l'hémolymph où ils se multiplient de façon importante tout en migrant vers les glandes salivaires. Les observations montrent que les spiroplasmes traversent les glandes salivaires également par un processus d'endocytose-exocytose (**fig. 17B**). Le franchissement des barrières intestinale et des glandes salivaires suggère la présence d'interactions protéiques entre *S. citri* et la surface des cellules de l'insecte (Kwon et al., 1999).

La P89 est la première protéine de surface identifiée chez *S. citri* comme pouvant être impliquée dans l'adhésion du spiroplasma aux cellules de l'insecte (Yu et al., 2000). Cette protéine, renommée ScARP1 (*Spiroplasma citri* adhesion related protein 1), possède 6 domaines répétés dans la région N-terminale (Berg et al., 2001). Au total, 8 ScARPs ont été identifiées dans le génome de *S. citri* GII3 et sont absentes chez la souche non-transmissible 44 de *S. citri* (Berho et al., 2006a; Killiny et al., 2006). La ScARP3d a été décrite comme favorisant l'entrée de *S. citri* dans des cellules d'insectes cultivées *in vitro* (Béven et al., 2012). Cinq autres protéines impliquées dans la transmission ont également été identifiées.

La spiraline est la lipoprotéine majeure de surface des spiroplasmes (Whitcomb et al., 1983). Les travaux menés sur *S. citri* ont montré que cette protéine agissait comme une lectine capable de lier les résidus glycosylés présents à la surface des cellules en culture et des glandes salivaires de *Circulifer haematoceps* (Duret et al., 2003, 2014; Killiny et al., 2005). La Sc76 est une lipoprotéine associée à un ABC transporteur. Cette protéine serait impliquée dans la colonisation des glandes salivaires de *C. haematoceps* (Boutareaud et al., 2004). Enfin les protéines P32 et PGK sont également impliquées dans l'interaction entre *S. citri* et les cellules des glandes salivaires de l'insecte (Killiny et al., 2006; Labroussaa et al., 2010, 2011).

Malgré une importante multiplication dans l'hémolymph, *S. citri* n'est pas pathogène pour son insecte vecteur (Lallemand, 1987; Markham, 1983). Néanmoins, les travaux menés sur la drosophile ont montré que l'infection expérimentale par *S. citri* entraînait des tremblements, une diminution de la locomotion et une mortalité des insectes (Herren and Lemaitre, 2011).



## 5. Spiroplasmes et immunité

La membranaire des spiroplasmes ne présente aucun des PAMPs reconnus par le système immunitaire des insectes (Bébéar C., 1974; Cole et al., 1973; Razin et al., 1973). La mise en place d'une réponse immunitaire dirigée contre ces bactéries devrait donc impliquer d'autres types de récepteurs. Par ailleurs, des travaux réalisés chez la drosophile et les crustacés montrent que les spiroplasmes sont capables d'induire et/ou moduler la réponse immunitaire de leur hôte.

### 5. 1. La drosophile

L'infection de la drosophile par *S. poulsonii* n'induit la production d'aucuns des 7 peptides antimicrobiens connus chez cet insecte (Hurst et al., 2003). Des résultats similaires ont été obtenus en comparant la souche virulente NSRO (male-killing strain) et non virulente NSRO-A (non-male-killing strain) (Anbutsu and Fukatsu, 2010). En revanche, l'infection par la souche NSRO entraîne une inhibition des gènes codant certains de ces peptides (Défensine, Diptéricine). Ce phénomène qui n'avait pas été observé lors des premiers travaux indique que *S. poulsonii* serait capable d'interagir avec des composants du système immunitaire de l'hôte pour réduire la production de peptides antimicrobiens. De fait, l'infection par *S. poulsonii* entraîne une augmentation de la sensibilité de la drosophile à l'infection par différents pathogènes (Herren and Lemaitre, 2011). L'induction de la réponse immunitaire par un mélange d'antigènes bactériens et fongiques ou l'utilisation d'un mutant  $Tl^{10b}$  (activation constitutive de la voie Toll), entraîne une diminution significative du nombre de spiroplasmes dans l'insecte (Anbutsu and Fukatsu, 2010; Hurst et al., 2003). Toutefois, le suivi de la charge bactérienne dans le mutant  $Tl^{10b}$  de drosophile au cours du temps a montré que *S. poulsonii* était capable de se multiplier. Enfin les résultats obtenus avec le mutant *Hemoless* (déficient en hémocytes) suggèrent que la composante cellulaire n'intervient pas dans la réponse à l'infection par *S. poulsonii* (Herren and Lemaitre, 2011). Ces résultats montrent que *S. poulsonii* peut être éliminé par le système immunitaire de la drosophile mais qu'il est capable, par des mécanismes encore inconnus, d'inhiber cette réponse pour y échapper.

## **5. 2. Les crustacés**

La réponse immunitaire des crustacés lors de l'infection par les spiroplasmes a d'abord été étudiée chez le crabe *Eriocheir sinensis*. L'adhésine ALP41 (homologue des protéines ScARP de *S. citri*) a été identifiée chez *S. eriocheiris* et utilisée pour suivre l'expression de gènes d'immunité (Meng et al., 2010). L'injection de la protéine ALP41 recombinante entraîne une modulation de l'expression de plusieurs gènes du crabe *E. sinensis* : une surexpression des gènes codant l'ALF (anti-lipopolysaccharide factor) et la Pro-phénoloxidase, et une répression des gènes codant la Pacifastine et la Péroxinectine 6. La surexpression du gène codant la Pro-phénoloxidase a été observée 12 heures après l'injection de l'ALP41. Cette observation est corrélée à la sous-expression du gène codant la Pacifastine, connue pour être un inhibiteur de la Pro-phénoloxidase (Breugelmans et al., 2009). Ce résultat suggère que l'infection par *S. eriocheiris* entraînerait la mise en place d'une réponse phénoloxidase chez le crabe. Enfin, l'injection de l'ALP41 entraîne une forte inhibition (visible pendant 48h) du gène codant la Péroxinectine 6. Cette protéine a été décrite comme intervenant dans la réponse cellulaire lors d'une infection bactérienne (Burge et al., 2009). Aussi, cette inhibition d'expression pourrait intervenir dans la pathogénicité de *S. eriocheiris*. L'ensemble de ces résultats suggère que l'infection par *S. eriocheiris* entraîne la mise en place d'une réponse immunitaire qui serait en partie inhibée par le spiroplasma.

Chez la crevette *Macrobrachium rosenbergii*, l'infection par *Spiroplasma sp.* MR-1008 entraîne entre 1 et 5 jours une augmentation de l'expression des gènes codant les enzymes AKP (alkaline phosphatase), ACP (acide phosphatase) et SOD (superoxyde dismutase), connues pour intervenir dans la réponse au stress, ainsi qu'une augmentation de l'activité de ces enzymes au niveau de l'hépatopancréas (Du et al., 2013). Ce résultat suggère que la présence de *S. citri* induit un stress oxydatif et que l'hépatopancréas joue un rôle lors la réponse à l'infection. Néanmoins, après 20 jours d'infection, l'activité de ces enzymes est fortement réduite. Les gènes codant la LGBP (lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein) et l' $\alpha$ 2-macroglobuline (inhibiteur de protéases) sont surexprimés lors de l'infection par *Spiroplasma sp.* MR-1008. Comme pour *S. eriocheiris*, la surexpression du gène codant le LGBP est étonnante car les spiroplasmes sont dépourvus de LPS et de  $\beta$ -1,3-glucane.

L'infection par *Spiroplasma sp.* MR-1008 entraîne aussi des modifications d'expression de lectines à la surface de l'hépatopancréas (Zhu et al., 2013). Ces lectines pourraient alors témoigner d'une réponse immunitaire locale lors de l'infection par *Spiroplasma sp.* MR-1008.

Les travaux menés chez les crustacés montrent qu'une réponse immunitaire est induite lors de l'infection par les spiroplasmes. Toutefois la forte mortalité observée chez les individus infectés suggère que cette réponse n'est pas suffisante. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus chez la drosophile où l'infection par *S. poulsonii* n'induit pas de réponse immunitaire mais semble au contraire l'inhiber.

La multiplication des spiroplasmes malgré la mise en place d'une réponse immunitaire, qu'elle soit naturelle ou induite, révèle une importante capacité d'adaptation chez ces bactéries. Cette adaptation, associée au mode de transmission, pourrait être l'un des moteurs permettant aux spiroplasmes de coloniser des niches écologiques de plus en plus diversifiées.

# Résultats

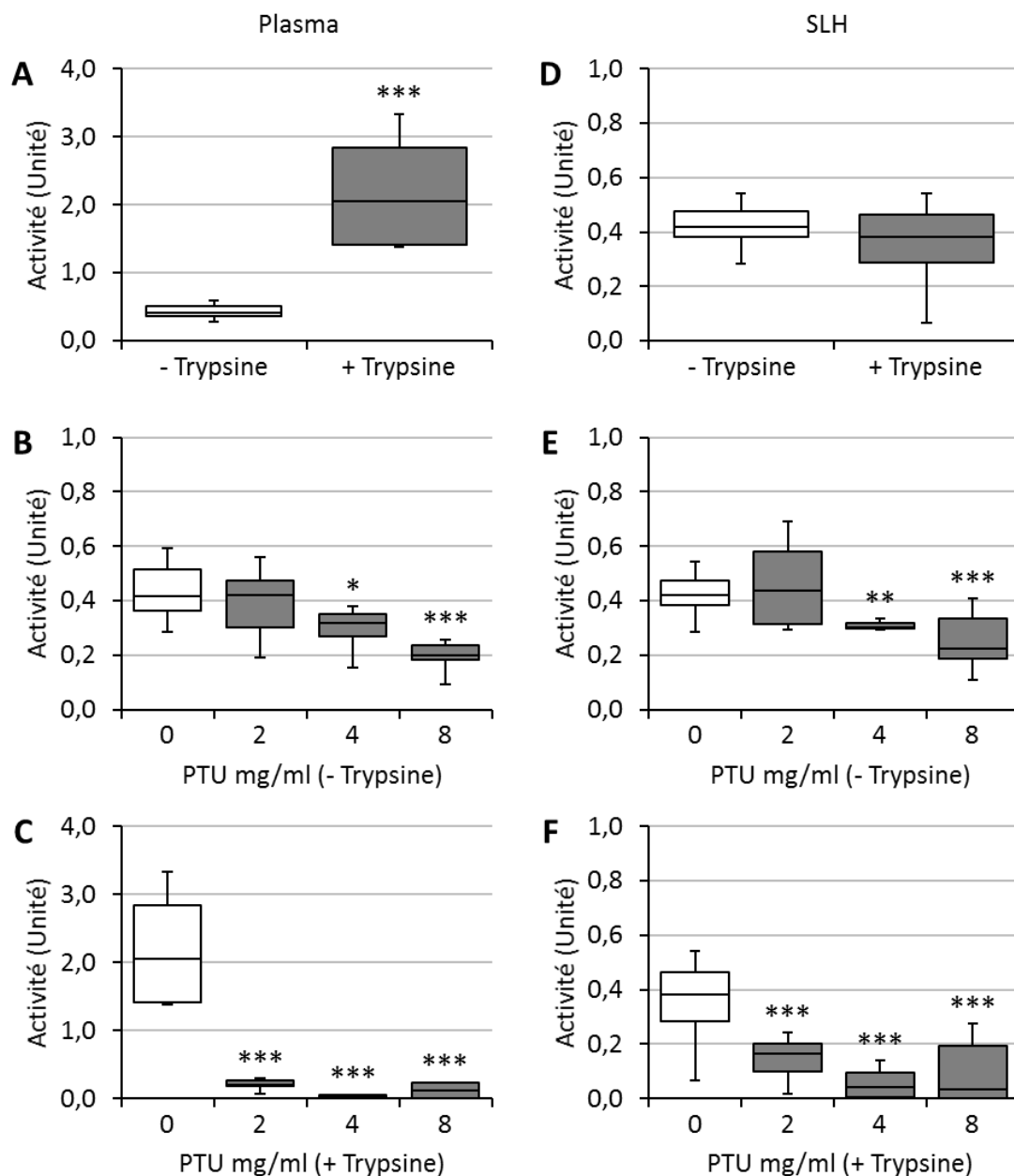
## I. Caractérisation du système immunitaire de *Circulifer haematoceps*

### 1. Caractérisation de la composante humorale

La composante humorale du système immunitaire des insectes est formée de l'ensemble des effecteurs plasmatiques produits et sécrétés par les hémocytes et les cellules du corps gras (Hoffmann and Reichhart, 2002; Jiang et al., 2010; Yassine and Osta, 2010). La plupart de ces effecteurs tels que la phénoloxidase et les peptides antimicrobiens, possèdent une activité antimicrobienne directe ou indirecte qui leur permet d'éliminer efficacement différents types de pathogènes (Cerenius et al., 2008; Yi et al., 2014). Sur la base des travaux réalisés chez plusieurs espèces d'insectes, j'ai donc cherché à mettre en évidence d'éventuelles activités antibactérienne et phénoloxidase dans le plasma de *C. haematoceps*.

#### **1. 1. Mise en évidence d'une activité phénoloxidase**

*In vitro*, l'activité phénoloxidase peut être mesurée en suivant l'hydrolyse de la L-dopamine en un produit de couleur marron (Saul et al., 1987). Pour rechercher la présence d'activité phénoloxidase chez *C. haematoceps*, l'hémolymph de l'insecte sain a été prélevée avant de séparer les hémocytes circulants et le plasma (**voir Matériels et Méthodes, paragraphe 3. 3**). Les hémocytes ont ensuite subi un choc thermique pour libérer leur contenu cytoplasmique, appelé surnageant de lysat hémocytaire (SLH). Le plasma et le SLH ont été mis en présence de L-dopamine et l'activité a été mesurée en présence ou absence d'un inhibiteur spécifique de phénoloxidase appelé PTU (Phényl-Thio-Urée) (Mishima et al., 1979). Les échantillons ont également été traités avec ou sans trypsine afin de révéler la présence de Pro-phénoloxidase. En effet, la trypsine active la Pro-phénoloxidase par un clivage de celle-ci (Saul et al., 1987). La vitesse maximale de dégradation de la L-dopamine a été mesurée par spectrophotométrie. Une unité d'activité représente une augmentation de 0,001 de la densité optique (DO<sub>490</sub>) par minute.

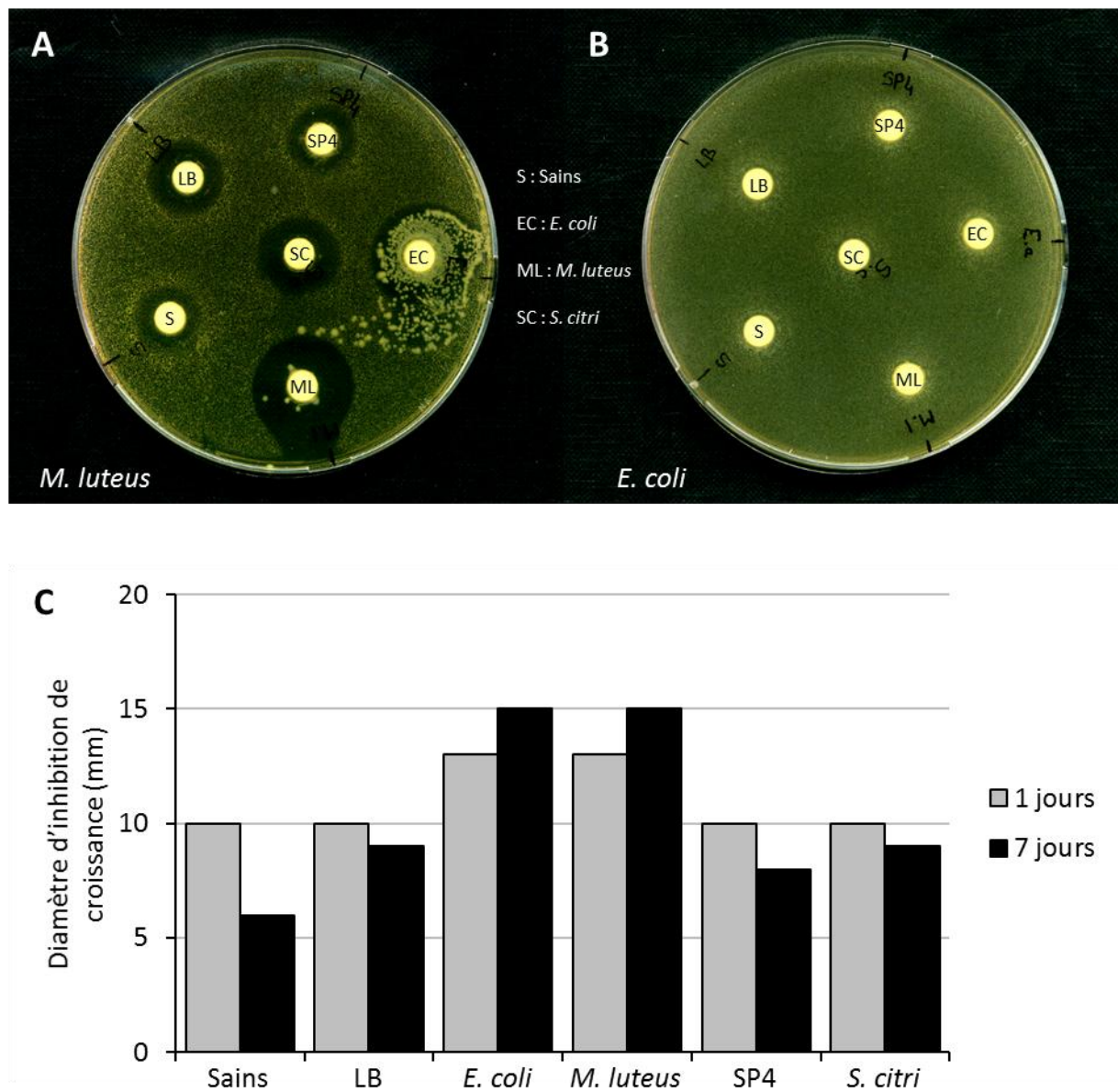


**Figure 18 : Mise en évidence d'une activité phénoloxidase chez *C. haematoceps*.** Le plasma et le SLH ont été mis en présence de L-dopamine (16 mg/ml). L'activité phénoloxidase correspond à la vitesse maximale d'hydrolyse de la L-dopamine et a été mesurée en présence ou absence de trypsine (1 mg/ml) et de PTU (2, 4 et 8 mg/ml). (A et D) Mesure de l'activité phénoloxidase dans le plasma et le SLH avec ou sans trypsine. (B et E) Mesure de l'activité phénoloxidase dans le plasma et le SLH sans trypsine et avec PTU. (C et F) Mesure de l'activité phénoloxidase dans le plasma et le SLH avec trypsine et PTU. Chaque graphe représente les données de 3 expérimentations indépendantes. Ces données ont fait l'objet d'un test statistique de Student. \*\*\*,  $p < 0,001$  ; \*\*,  $p < 0,01$  ; \*,  $p < 0,05$

Les résultats du suivi de la dégradation de la L-dopamine montrent qu'une activité phénoloxidase est présente dans les 2 types d'échantillons. Au niveau du plasma, cette activité est de 0,42 en moyenne (**fig. 18A**). En présence de trypsine, l'activité est de 2,05, soit une augmentation significative d'un facteur 5. Ce résultat indique la présence de Pro-phénoloxidase dans le plasma. L'ajout de PTU à 4 et 8 mg/ml a entraîné une inhibition d'activité de 25% et 50% respectivement (**fig. 18B**). En présence de trypsine, l'ajout de PTU à 2, 4 et 8 mg/ml a entraîné une inhibition plus importante de l'activité, soit 90%, 99% et 90% respectivement (**fig. 18C**).

Au niveau du SLH, l'activité phénoloxidase est de 0,42 en moyenne (**fig. 18D**). L'ajout de trypsine n'a cependant eu aucun effet significatif sur l'activité (0,38) contrairement à ce qui a été observé dans le plasma. Ce résultat suggère que seule une forme active de la Phénoloxidase serait associée au SLH. Enfin, l'ajout de PTU à 4 et 8 mg/ml a entraîné une inhibition de 30% et 50% respectivement (**fig. 18E**). En présence de trypsine, l'ajout de PTU 2, 4 et 8 mg/ml a entraîné une inhibition de l'activité de 50%, 90% et 95% respectivement (**fig. 18F**).

Le suivi de l'hydrolyse de la L-dopamine a donc permis de mettre en évidence la présence d'une activité phénoloxidase (Mishima et al., 1979) au niveau du plasma et des hémocytes circulants (SLH). Les résultats obtenus montrent que la Phénoloxidase est présente sous ses formes actives et inactives dans le plasma alors que seule la forme active est présente au niveau des hémocytes circulants. Ces résultats sont en accord avec les travaux menés chez *Manduca sexta* chez qui la forme inactive de la Phénoloxidase est majoritairement présente dans le plasma et non au niveau des hémocytes circulants (Saul et al., 1987).



**Figure 19:** Mise en évidence d'une activité antibactérienne dirigée contre *M. luteus* dans le plasma de *C. haematoceps*. L'activité antibactérienne a été mesurée à partir de 30  $\mu$ l de plasma d'insectes sains et injectés avec les milieux LB et SP4 et les bactéries *E. coli*, *M. luteus* et *S. citri*. Pour les insectes infectés, le plasma a été isolé 24 heures ou 7 jours après injection et déposé sur un disque d'antibiogramme afin de réaliser un test d'inhibition de croissance sur *E. coli*, *M. luteus* et *S. citri*. (A) Résultat du test sur un tapis bactérien de *M. luteus* avec les échantillons de plasma prélevés 7 jours après injection. (B) Résultats du test sur un tapis bactérien d'*E. coli*. (C) Mesure des diamètres d'inhibition de croissance de *M. luteus*.



## **1. 2. Mise en évidence d'une activité antibactérienne**

Parmi les effecteurs plasmatiques libérés lors de l'infection, certains ont une activité antibactérienne directe et une spécificité d'action pour un type de pathogène donné (Yi et al., 2014). Le but des expériences réalisées dans cette partie a été de mettre en évidence une activité antibactérienne dans le plasma de *C. haematoceps*. Le plasma a été isolé 1 et 7 jours après injection de bactéries (*E. coli*, *M. luteus* et *S. citri*) ou de milieu de culture (LB ou SP4), et un test d'inhibition de croissance a été réalisé sur chacune des bactéries injectées. L'activité antibactérienne a également été mesurée dans le plasma d'insectes sains. Pour chaque échantillon, le diamètre d'inhibition de croissance a été mesuré en soustrayant celui du disque d'antibiogramme (**voir Matériels et Méthodes, paragraphe 3. 4**).

Les résultats du test réalisé sur *M. luteus* montrent que pour chaque condition, le plasma entraîne la formation d'une zone d'inhibition de croissance (**fig. 19A et 19C**). Chez les insectes sains, les diamètres d'inhibition de croissance sont de 10 mm au jour 1 et 6 mm au jour 7. Ces résultats indiquent qu'une activité bactérienne est déjà présente dans le plasma des insectes sains. Pour le plasma prélevé 1 et 7 jours après injection de milieu LB, les diamètres d'inhibition de croissance sont respectivement de 10 et 9 mm, comme ceux obtenus après injection de *S. citri*. Ces résultats sont également proches de ceux obtenus après injection de milieu SP4, soit 10 mm et 8 mm. Pour toutes ces conditions, le diamètre d'inhibition de croissance de *M. luteus* est plus faible lorsque le plasma a été prélevé 7 jours après injection. Après injection d'*E. coli* et *M. luteus*, les diamètres d'inhibition sont plus importants et augmentent en fonction du temps, soit 13 mm et 15 mm.

Concernant les tests réalisés sur *E. coli* et *S. citri*, aucun des échantillons de plasma n'entraîne pas la formation d'une zone d'inhibition de croissance (**fig. 19**). La résistance d'*E. coli* face aux effecteurs plasmatiques de *C. haematoceps* a été confirmée lors du test d'inhibition de croissance réalisé sur culture de *M. luteus*, par le développement de colonies autour du disque d'antibiogramme sur lequel le plasma d'insectes injectés avec *E. coli* avait été déposé (**fig. 19A**). Cette observation indique par ailleurs que des bactéries *E. coli* sont encore présentes dans le plasma, 7 jours après injection. Pour *S. citri*, aucune des photos prises n'a permis de visualiser correctement les colonies sur milieu gélosé, c'est pourquoi elles ne sont pas présentées ici.

Les résultats des tests d'inhibition de croissance réalisés chez *C. haematoceps* ont permis de mettre en évidence la présence dans le plasma d'une activité antibactérienne efficace contre *M. luteus* mais pas contre *E. coli* ni *S. citri*. Les différents effecteurs antibactériens présents dans le plasma ne semblent donc pas jouer un rôle majeur dans la réponse à l'infection par ces 2 bactéries, contrairement à *M. luteus*. Par ailleurs, seule l'injection des bactéries *E. coli* et *M. luteus* a induit la production d'effecteurs antibactériens dans le plasma. Enfin la présence d'une activité antibactérienne dans le plasma prélevé 7 jours après injection des bactéries montre que cette induction est durable.

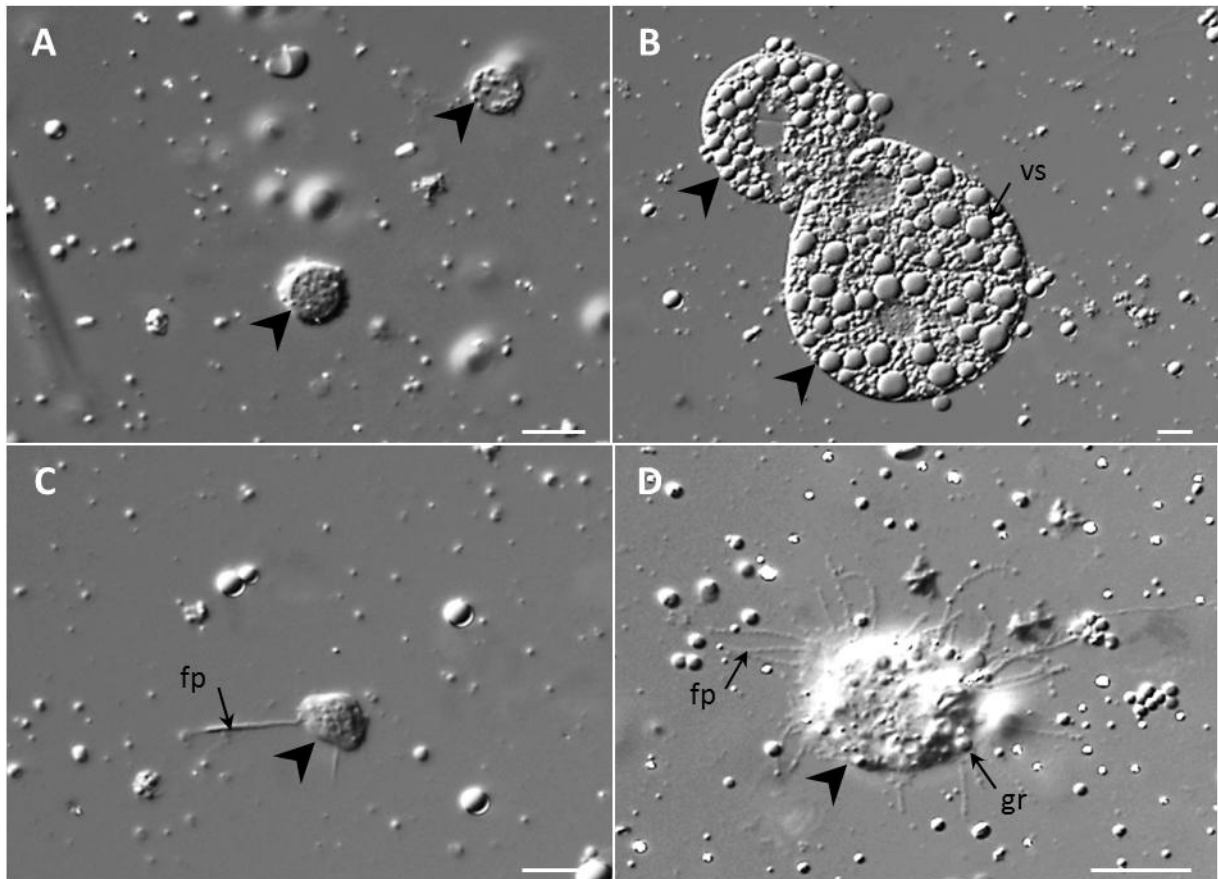
Les résultats de la caractérisation de la composante humorale de *C. haematoceps* ont montré la présence d'une activité antibactérienne inductible et d'une activité phénoloxidase. Ces deux activités étant retrouvées chez la plupart des insectes étudiés, il semble donc que la composante humorale de *C. haematoceps* soit fonctionnelle.

## **2. Caractérisation de la composante cellulaire**

Différents types d'hémocytes ont été décrits chez les insectes (Jiang et al., 2010; Laughton et al., 2011; Lavine and Strand, 2002) et plusieurs fonctions immunitaires leur ont été attribuées. La phagocytose et la nodulation sont parmi les plus communément décrites. J'ai donc cherché à caractériser les différents types hémocytaires présents chez *C. haematoceps* avant d'étudier la réponse cellulaire lors d'une infection bactérienne.

### **2. 1. Identification des différents types d'hémocytes**

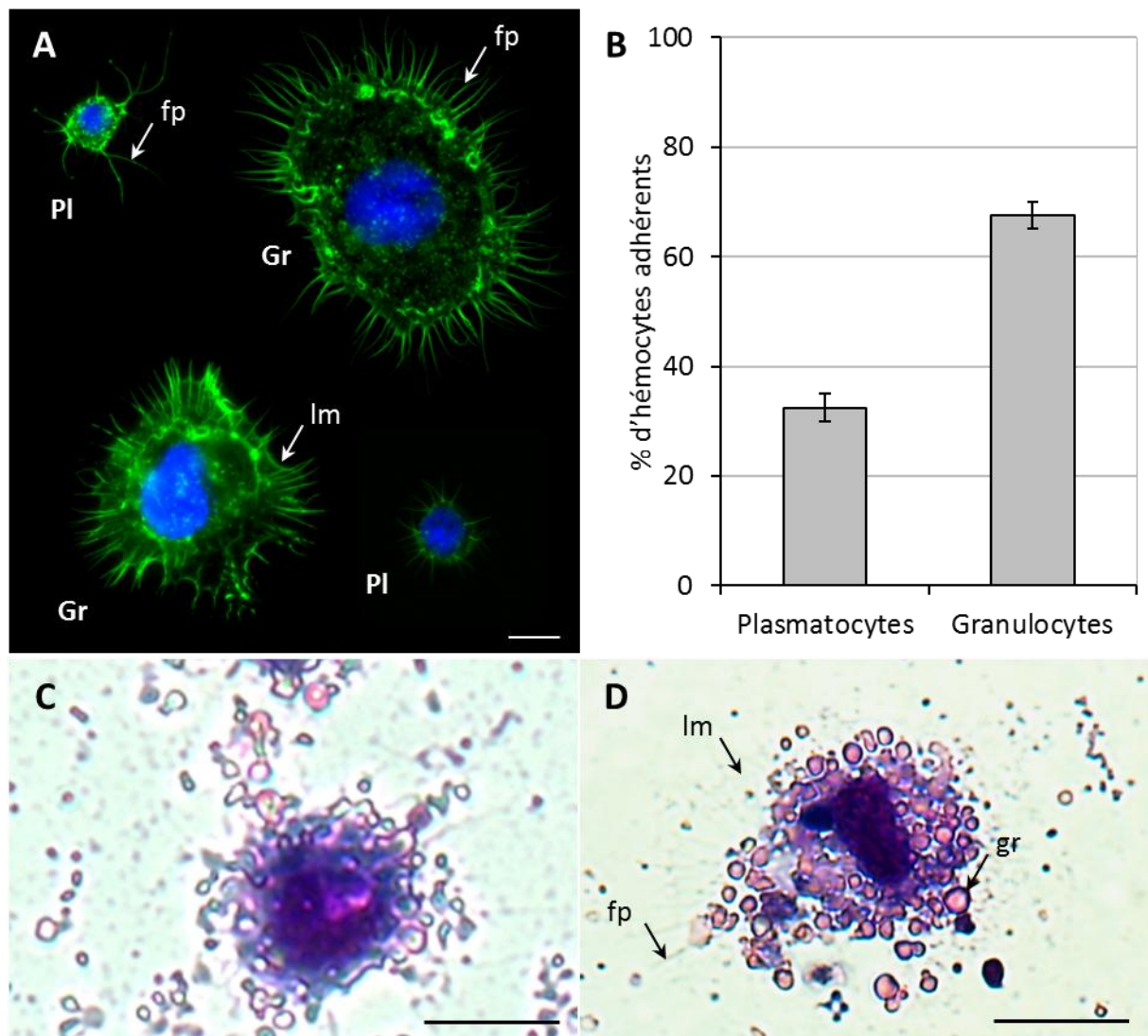
La caractérisation des hémocytes a été faite à partir d'hémolymphe prélevée chez l'insecte sain (**voir Matériels et Méthodes, paragraphe 3. 1**). L'hémolymphe a ensuite été placée entre lame et lamelle pour être directement observée au microscope optique en contraste inter-différentiel (DIC), ou placée sur lamelle pendant 2h pour permettre l'adhésion des hémocytes au verre.



**Figure 20:** Observation des 4 types d'hémocytes circulants de *C. haematoceps*. Les hémocytes circulants ont été observés au microscope optique en contraste inter-différentiel (DIC), à partir d'hémolymphe prélevée sur insectes sains. Les critères morphologiques (taille, granulosité du cytoplasme, présence de filopodes) ont permis d'identifier 4 types d'hémocytes qui sont (A) les pro-hémocytes, (B) les sphérulocytes, (C) les plasmatocytes et (D) les granulocytes. Les cellules sont indiquées avec une pointe de flèche. fp : filopode, gr : granule, vs : vésicule. Barre d'échelle : 10  $\mu$ m.

La **figure 20** présente les types hématocytaires qui ont été identifiés. Différentes cellules ont pu être observées et distinguées par leur taille, leur contenu cytoplasmique (présence ou non de granules et de vésicules) et la présence ou non de filopodes et de lamellipodes. De petites cellules circulaires (10  $\mu\text{m}$  de diamètre en moyenne) et sans différenciation morphologique ont été observées (**fig. 20A**). Au vu des travaux réalisés chez le puceron, ces cellules pourraient être des précurseurs, appelés pro-hématocytes, pouvant se différencier en différents types hématocytaires (Lavine and Strand, 2002; Schmitz et al., 2012; Tzou et al., 2002). D'autres cellules de taille plus importante (50  $\mu\text{m}$  de diamètre en moyenne) et présentant un cytoplasme riche en vésicules ont été identifiées (**fig. 20B**). Ces cellules présentent le même aspect cytoplasmique et la même taille que les sphérulocytes du puceron (Schmitz et al., 2012). Chez le puceron, ces hématocytes jouent un rôle majeur dans la coagulation et sont capables de fixer la Pro-phénoloxidasase du plasma (Ling and Yu, 2005; Schmitz et al., 2012). L'absence de filopodes au niveau de la membrane des sphérulocytes et des pro-hématocytes suggère un phénotype non-adhérent.

L'observation de l'hématolymph entre lame et lamelle a également permis d'identifier des hématocytes présentant des filopodes (**fig. 20C et D**). La majorité de ces hématocytes sont de petite taille (entre 10 et 15  $\mu\text{m}$  de diamètre) avec un cytoplasme ne contenant ni granules ni vésicules, et ne possèdent que quelques longs filopodes (**fig. 20C**). Les hématocytes restants sont de plus grande taille (entre 20 et 30  $\mu\text{m}$  de diamètre), avec un cytoplasme riche en granules et de nombreux filopodes sur l'ensemble du pourtour cellulaire (**fig. 20D**). Chez les insectes, les hématocytes adhérents les plus connus sont les plasmatocytes et les granulocytes. Sur la base des travaux réalisés chez le puceron (Laughton et al., 2011; Schmitz et al., 2012), les hématocytes adhérents de petite taille semblent être des plasmatocytes tandis que les autres cellules adhérentes seraient des granulocytes. Les plasmatocytes et les granulocytes sont majoritairement impliqués dans les processus de phagocytose et d'encapsulation (Lavine and Strand, 2002). Enfin, aucune cellule présentant des critères morphologiques apparentés aux oenocytoides n'a été observée.



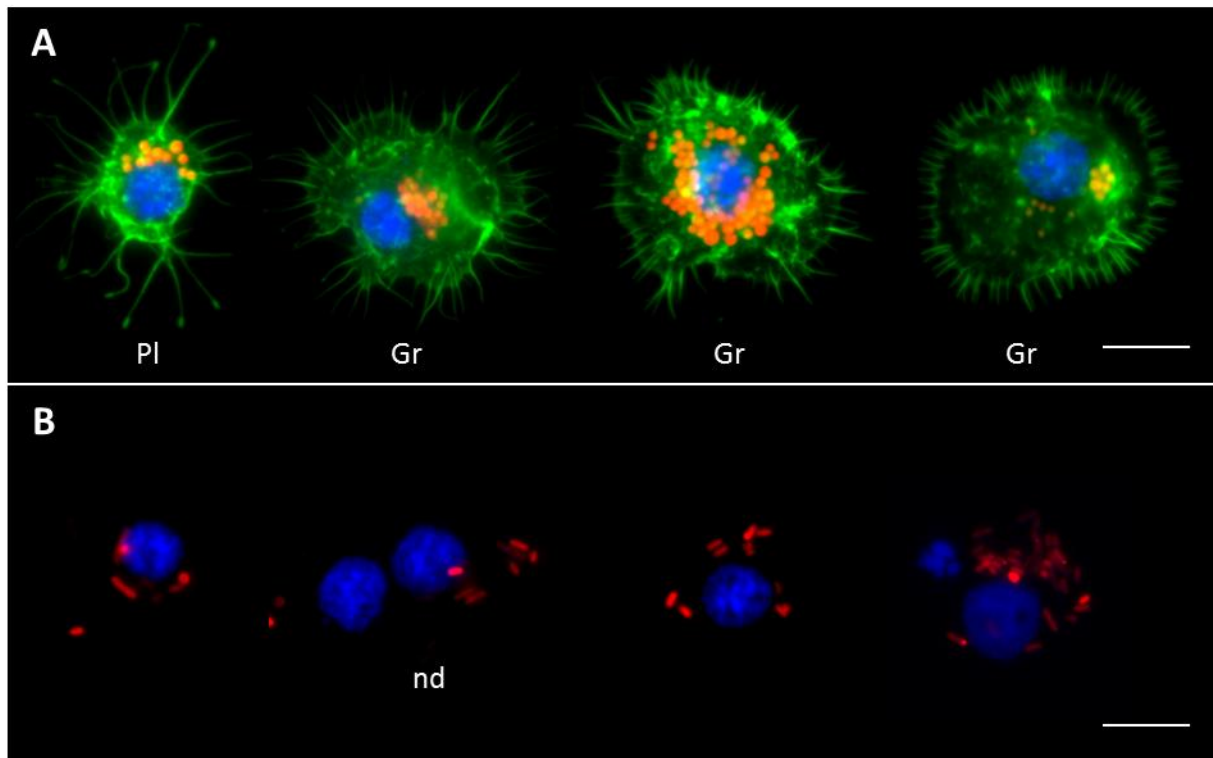
**Figure 21:** Caractérisation et dénombrement des différents types d'hémocytes adhérents de *C. haematoceps*.

(A) Après avoir adhéré sur lame de verre, les hémocytes ont été fixés au PAF (4%) et perméabilisés au Triton X-100 (0,01%). Le cytosquelette d'actine a été marqué à la phalloïdine Alexa-568 (vert) et le noyau au DAPI (bleu). (B) Les hémocytes ont été observés et dénombrés sur 100 champs de microscope à épifluorescence. L'histogramme représente le pourcentage de chacun des types hémocytaires adhérents. (C et D) Coloration de plasmatocyte et de granulocyte au May-Grünwald Giemsa (MGG). Après avoir adhéré sur lame de verre, les hémocytes ont été fixés au méthanol pur avant d'être colorés au MGG puis observés en microscopie optique. Im : lamellipode ; fp : filopode ; Gr : Granulocyte ; gr : granule ; Pl : Plasmatocyte. Barre d'échelle : 10 µm.

Les hémocytes circulants ont aussi été soumis à un test d'adhésion. Après lavage des lamelles, les hémocytes adhérents ont été observés au microscope à épifluorescence (**fig. 21A**). Les résultats des observations montrent que seuls les plasmatoctes et les granulocytes ont adhéré à la lamelle de verre ; aucun pro-hémocyte ni sphérulocyte n'a été observé. Ce résultat s'explique par l'absence de filopodes et confirme ainsi l'hypothèse d'un phénotype non-adhérent chez ces hémocytes. Le marquage fluorescent du cytosquelette d'actine (phalloïdine Alexa-568) indique la présence de filopodes chez les plasmatoctes et les granulocytes. Ces résultats confirment les observations faites en contraste interférentiel (DIC). Des lamellipodes (prolongements cytoplasmiques) ont également été observés chez les granulocytes. Les 2 types d'hémocytes ont été dénombrés et les résultats indiquent que les plasmatoctes représentent 65% des hémocytes adhérents de *C. haematoceps* contre 35% pour les granulocytes (**fig. 21B**). Ces valeurs sont identiques à celles obtenues chez le puceron *A. pisum* (Schmitz et al., 2012).

En parallèle, après avoir adhéré sur lamelle, les plasmatoctes et les granulocytes ont été fixés puis colorés avec une solution de May-Grünwald Giemsa (MGG) avant d'être observés au microscope optique. La coloration de MGG est utilisée en cytologie pour déterminer le pH du contenu cellulaire (Delgado et al., 2001). Pour les plasmatoctes, la coloration du cytoplasme est bleue et correspond à un caractère basophile (Browne et al., 2013; Caselín-Castro et al., 2010; Kuchel et al., 2010) (**fig. 21C**). Les granulocytes possèdent des granules dont la coloration rose violet indique un caractère neutrophile (**fig. 21D**).

Les hémocytes de *C. haematoceps* présentent des morphologies et des colorations similaires à celles observées chez le puceron (Schmitz et al., 2012) et suggèrent que la composante cellulaire du système immunitaire de *C. haematoceps* serait fonctionnelle. Pour vérifier cette hypothèse j'ai étudié la capacité de phagocytose des granulocytes et des plasmatoctes.



**Figure 22:** Phagocytose de billes de latex et de bactéries *E. coli* fluorescentes par les hémocytes de *C. haematocaps*. Les hémocytes adhérents ont été isolés 24 heures après injection de billes de latex fluorescentes (A) ou d'*E. coli* DH5 $\alpha$ -DsRed fluorescentes (B). Le cytosquelette d'actine a été marqué à la phalloïdine Alexa-568 (vert) et le noyau au DAPI (bleu). Les billes de latex et les bactéries ont été colorées en rouge. Pour *E. coli*, les longueurs d'ondes d'émission du DsRed et celle de l'Alexa-568 étant les mêmes, le cytosquelette d'actine n'a pas pu être marqué. Gr : Granulocytes, nd : nodule, PI : Plasmatocytes. Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ .



## **2. 2. Etude de la phagocytose**

Au cours d'une infection, la phagocytose par les hémocytes joue un rôle majeur dans l'élimination des pathogènes et fait intervenir des récepteurs membranaires capables de lier des antigènes de surfaces tels que le LPS (Dziarski, 2004). Afin de vérifier la capacité de phagocytose des plasmatoctes et des granulocytes chez *C. haematoceps*, des insectes ont été injectés avec des billes de latex (corps abiotiques) ou des bactéries *E. coli* DH5 $\alpha$ -DsRed (corps biotiques non-pathogènes). Après 24 heures, les hémocytes adhérents ont été isolés puis marqués avant d'être observés au microscope à épifluorescence (**Mat. et Met. 3. 2**).

Les observations ont montré la présence de billes de latex au niveau du cytoplasme des 2 types d'hémocytes adhérents (**fig. 22A**). Le marquage du cytosquelette d'actine indique que les plasmatoctes comme les granulocytes sont capables de phagocyter un corps abiotique. Les observations ont montré la présence d'*E. coli* dans le cytoplasme des cellules adhérentes (**fig. 22B**). Des regroupements de plusieurs hémocytes similaires à des nodules et associés à des bactéries ont également été observés, ce qui n'est pas le cas avec les billes de latex. Ces résultats indiquent que les hémocytes de *C. haematoceps* sont capables de phagocyter des bactéries et de former des nodules. Toutefois pour ces expériences, le cytosquelette d'actine n'ayant pas pu être marqué, les observations ne permettent pas de savoir si les 2 types d'hémocytes adhérents sont capables de phagocyter les bactéries et de former des nodules. Afin d'étudier le processus de phagocytose, une approche par microscopie électronique à transmission a été utilisée. Toutefois, aucune des tentatives effectuées n'a donné d'images exploitables.

Ces résultats indiquent qu'après l'injection de corps biotiques et abiotiques, les hémocytes de *C. haematoceps* sont capables de mettre en place 2 types de réponse qui sont la phagocytose et la nodulation. La phagocytose est visible en présence de billes et de bactéries alors que la nodulation l'est seulement en présence de bactéries.





**Figure 23 :** Mise en évidence d'une activité phénoloxidase au niveau des hémocytes adhérents de *C. haematoceps*. Les hémocytes adhérents d'insectes sains ont été placés en incubation pendant 4 h à l'obscurité avec une solution d'éthanol (35%) contenant de la L-dopamine (16 mg/ml) puis observés au microscope optique. (A, B) Hémocytes avec une activité phénoloxidase (coloration marron indiquée par une flèche). (C) Hémocytes sans activité phénoloxidase. Barre d'échelle : 10 μm.

### **2. 3. Mise en évidence d'une activité phénoloxidase**

Une activité phénoloxidase associée aux hémocytes (SLH) a été identifiée (**fig. 18**). Toutefois le protocole utilisé n'a pas permis de déterminer quels types cellulaires possédaient cette activité. J'ai donc cherché à savoir si une activité phénoloxidase était présente au niveau des hémocytes adhérents. Pour cela les hémocytes adhérents d'insectes sains ont été mis en présence de L-dopamine et observés au microscope optique (**voir Matériels et Méthodes, paragraphe 3. 4**).

Après 4 heures d'incubation, un précipité marron caractéristique d'une activité phénoloxidase a été observé pour la plupart des hémocytes adhérents. Pour certains d'entre eux, le précipité était localisé au niveau de vésicules (**fig. 23A**) alors que pour d'autres il était diffus dans le cytoplasme (**fig. 23B**). Au vu des caractéristiques morphologiques (taille, granulosité du cytoplasme), les observations montrent que l'activité phénoloxidase est présente à la fois chez les granulocytes et les plasmacytes. Quelques rares hémocytes ne présentent aucun signal (**fig. 23C**). Ces résultats indiquent donc que les hémocytes adhérents de *C. haematoceps* possèdent une activité phénoloxidase. Néanmoins, le protocole utilisé n'a pas permis d'affirmer avec certitude que l'activité phénoloxidase mise en évidence était présente au niveau intracellulaire. En effet, des travaux menés sur *Manduca sexta* ont pu montrer que la Pro-phénoloxidase du plasma pouvait se lier à la surface des hémocytes adhérents (Ling and Yu, 2005). L'absence apparente d'oénocytoides (cellules productrices de Pro-phénoloxidase) appuie cependant l'hypothèse d'une production de cette enzyme par les hémocytes adhérents de *C. haematoceps*.

La caractérisation du système immunitaire de *C. haematoceps* a permis de mettre en évidence une composante humorale fonctionnelle avec une activité antibactérienne efficace contre *M. luteus*, ainsi qu'une activité phénoloxidase dans le plasma. La composante cellulaire semble également fonctionnelle car les hémocytes possèdent une activité phénoloxidase, sont capables de phagocyter des billes de latex et des bactéries *E. coli*, et de former des nodules. L'ensemble de ces résultats suggère que le système immunitaire de *C. haematoceps* peut répondre de manière efficace contre différents types d'infection. Les gènes impliqués dans ces différents processus immunitaires restent encore à identifier.

### **3. Identification des gènes d'immunité de *C. haematoceps***

Les processus immunitaires précédemment décrits sont présents chez la plupart des insectes (Hoffmann and Reichhart, 2002; Jiang et al., 2010; Yassine and Osta, 2010). Pour la majorité, les gènes impliqués dans la mise en place de ces processus ont été identifiés (Altincicek et al., 2008b; Dziarski, 2004; Ferrandon et al., 2004; Kanost, 1999; Liu et al., 2013). Le but des travaux réalisés dans cette partie a été de rechercher, chez *C. haematoceps*, les gènes qui pourraient être impliqués dans l'activité antibactérienne du plasma et dans la phagocytose des bactéries par les hémocytes adhérents. Le génome de *C. haematoceps* n'ayant pas été séquencé, la recherche de gènes d'immunité a été réalisée en utilisant une approche par hybridation soustractive. Cette technique permet de mettre en évidence et d'identifier des gènes dont l'expression diffère entre 2 populations (Diatchenko et al., 1996). Ici, l'hybridation soustractive a été utilisée pour identifier les gènes qui sont surexprimés au cours d'une infection bactérienne. Dans de nombreux travaux, cette technique a permis d'identifier plusieurs gènes d'immunité (Anselme et al., 2008; Chen et al., 2012; Jeffroy et al., 2013; K Fraser Clark, 2012; Liu et al., 2013; Zhang et al., 2010). Pour avoir une vision élargie des gènes d'immunité de *C. haematoceps*, l'hybridation soustractive a été réalisée sur des insectes infectés par *E. coli*, *M. luteus* et *S. citri*. Certains des gènes identifiés ont été retenus et leur expression a été suivie au cours de différentes infections bactériennes.

#### **3. 1. Hybridation soustractive d'ADNc**

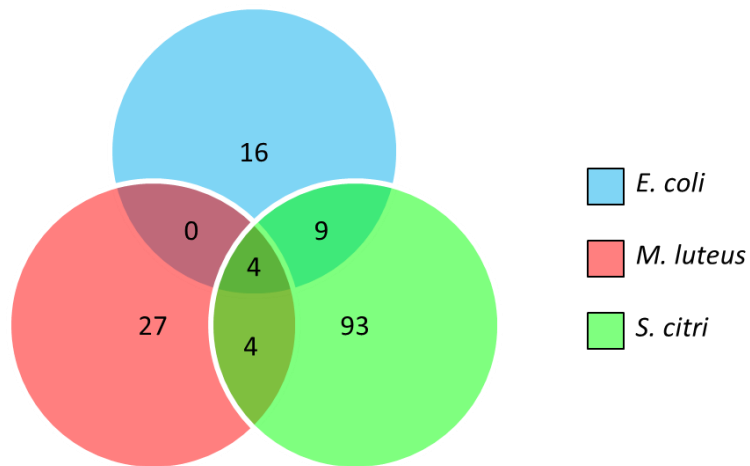
Les insectes ont été injectés avec une culture bactérienne à  $10^8$  bactéries/ml. Les insectes contrôles ont subi une injection de milieu de culture (LB ou SP4). Pour chaque condition, les ADNc ont été synthétisés à partir d'un mélange d'ARN totaux extraits à des temps précoces de l'infection (**voir Matériel et Méthodes, paragraphe 2. 4**). Ce choix s'explique par le fait que la grande majorité des processus immunitaires, tels que la reconnaissance des pathogènes et l'expression des gènes codant des peptides antimicrobiens, sont mis en place dans les premières 24 heures de l'infection (Asling et al., 1995; Jarosz, 1993; Liu et al., 2009). Après avoir vérifié l'efficacité de l'hybridation par PCR, les ADNc soustraits ont été clonés puis séquencés.

	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. citri</i>
Nombre de séquences	324	353	343
Séquences sans homologie	22 (6,8%)	13 (3,7%)	59 (17,2%)
Séquences non-codantes	215 (66,3%)	179 (50,7%)	153 (44,6%)
Séquences codantes	87 (26,9%)	161 (45,6%)	131 (38,2%)
Longueur moyenne (pb)	336	361	313

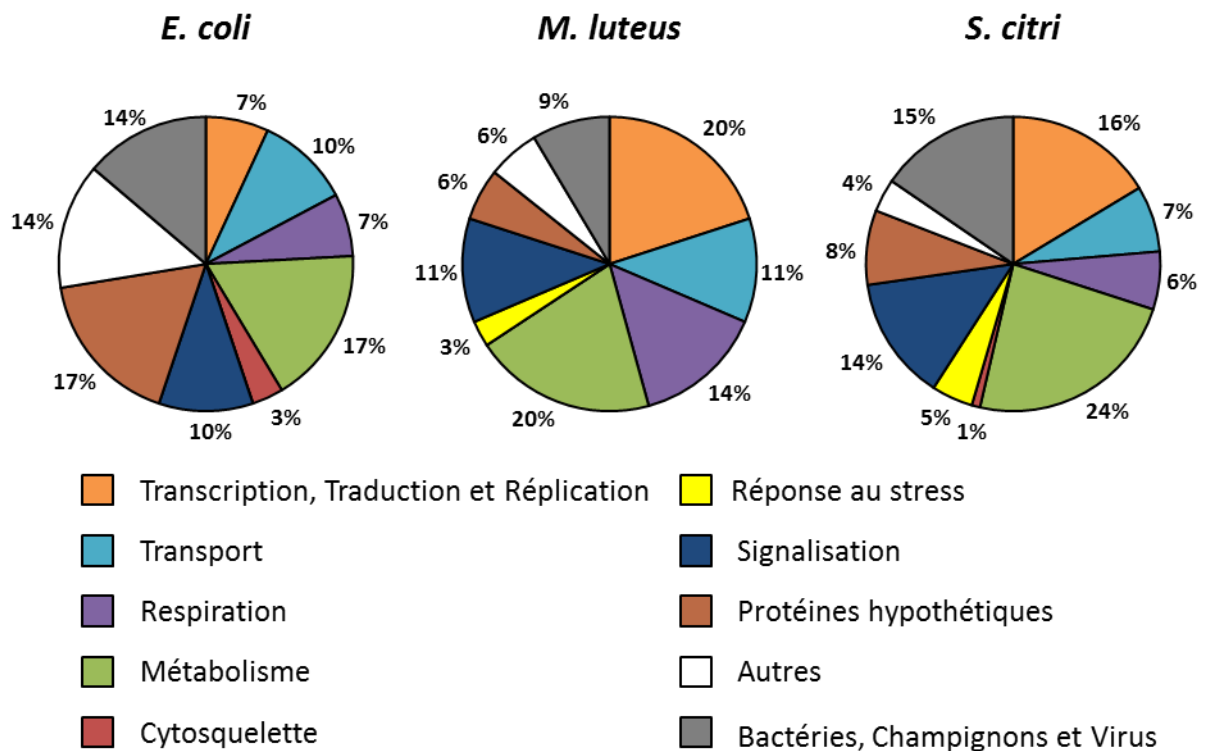
**Tableau 2:** Bilan de l'analyse par BlastX avec Blast2GO des ESTs de *C. haematoceps* issues des 3 banques soustractives.

Au total, 1020 clones ont été séquencés à partir des 3 banques soustractives (*E. coli*, *M. luteus* et *S. citri*) (**Tab. 2**). Pour chaque banque, un nombre équivalent de clones a été séquencé, soit 324 pour la banque d'*E. coli*, 353 pour celle de *M. luteus* et 343 pour celle de *S. citri*. Les ESTs ont ensuite été analysées et annotées avec l'outil BlastX via le logiciel Blast2GO. Les résultats montrent que près de 10% des ESTs ne présentent aucune homologie avec les séquences déposées dans les banques de données protéiques. Ce résultat s'explique notamment par le manque de données disponibles concernant les Hémiptères chez qui seuls les génomes du puceron *A. pisum* et du réduve *Rhodnius prolixus* ont été séquencés. La majorité des ESTs sans homologie sont issues de la banque soustractive réalisée avec *S. citri*. L'analyse avec l'outil BlastX a également permis d'éliminer les séquences non-codantes (ARNs ribosomiques et mitochondriaux). La présence de ces séquences en proportion importante, soit 54% en moyenne, représente l'une des limites de la technique d'hybridation soustractive. En effet, l'abondance des ARN ribosomiques et mitochondriaux dans les extraits d'ARN total rend difficile leur élimination par hybridation soustractive. Enfin, la longueur moyenne des ESTs de chaque banque a été estimée. Pour les 3 banques soustractives, cette longueur est comprise entre 300 et 400 pb et reflète la qualité des ARN ainsi que le bon déroulement de chacune des hybridations soustractives.

La redondance des ESTs issues d'une même banque soustractive a été estimée à partir des résultats d'analyse des séquences codantes. Deux ESTs sont redondantes lorsqu'elles présentent une homologie avec un même gène. Cette analyse a permis de mettre en évidence une redondance de 65% et 80% dans les banques soustractives d'*E. coli* et de *M. luteus*, mais seulement de 15% dans celle de *S. citri*. Ce résultat indique que la diversité des gènes exprimés par *C. haematoceps* en réponse à *S. citri* est élevée et suggère la mise en place d'une réponse immunitaire complexe. Pour chaque cas de redondance, seule l'EST dont l'E-value est la plus faible a été retenue (**voir tableau en annexe**).



**Figure 24** Estimation de la redondance des ESTs parmi les séquences codantes issues des 3 banques soustractives.



**Figure 25:** Classement par catégories fonctionnelles avec Blast2GO des ESTs non-redondantes de *C. haematoceps* issues des banques soustractives.

### **3. 2. Classement des ESTs par catégories fonctionnelles**

Sur les 110 ESTs de la banque soustractive de *S. citri*, 13 présentent une redondance avec celles de la banque soustractive d'*E. coli* et 8 avec celles de la banque soustractive de *M. luteus* (**fig. 24**). Seulement 4 sont communes aux 3 banques soustractives. Les gènes correspondants codent le Facteur d'élongation-1 $\alpha$ , la Vitellogénine, la Cytochrome oxydase et une Sérine protéase. Enfin, aucune EST n'est redondante entre les banques soustractives d'*E. coli* et de *M. luteus*. Ces résultats montrent que peu de gènes sont communs entre les 3 banques soustractives et suggèrent que la réponse immunitaire mise en place par *C. haematoceps* est spécifique du type de bactérie injectée. Les résultats de l'analyse des ESTs par Blast2GO ont permis d'établir une liste non-redondante de l'ensemble des ESTs des 3 banques soustractives (**voir tableau en annexe**). Les gènes correspondants à ces séquences ont été classés dans 10 catégories fonctionnelles différentes. La proportion des gènes issus des 3 banques dans chacune des catégories fonctionnelles est montrée sur la **figure 25**.

De manière générale, la proportion des gènes dans chaque catégorie est différente d'une banque soustractive à l'autre. Cependant la répartition fonctionnelle globale des ESTs semble indiquer que les réponses à *M. luteus* et *S. citri* sont similaires. En effet, des gènes impliqués dans la réponse au stress ont été identifiés dans ces 2 banques alors qu'aucun n'est présent dans la banque d'*E. coli*. De plus, les gènes impliqués dans les processus de transcription, traduction et réplication ainsi que dans la signalisation sont fortement représentés dans les banques de *M. luteus* et *S. citri* (environ 18% des séquences). Ce résultat peut en partie s'expliquer par le fait que les Mollicutes (classe à laquelle les spiroplasmes appartiennent) sont proches phylogénétiquement des bactéries à coloration de Gram positive (Weisburg et al., 1989). Par ailleurs, aucun gène codant des protéines du cytosquelette (actine) n'a été identifié dans la banque de *M. luteus*. L'absence de ces gènes est à mettre en relation d'une part avec le rôle de l'actine dans la phagocytose et d'autre part avec le fait que ce processus n'intervienne pas de façon majeure dans la réponse du moustique *Armigeres subalbatus* à l'infection par *M. luteus* (Hillyer et al., 2003b).

Tableau 3 : Liste des séquences associées à des gènes potentiellement immunitaires

Clones	Soustraction	Nom des protéines	Accession	Organismes	E-value	Fonctions immunitaire potentielle	Références
311_T7P_23	<i>S. citri</i>	ribosomal protein S7e	ABD98780	<i>Graphocephala atropunctata</i>	8,14E-47	<u>Récepteurs</u> liaison au GLPS	(Shao et al., 2004)
84_T7P_84	<i>S. citri</i>	adenosine A3 receptor	AAG35154	<i>Callimico goeldii</i>	2,99E+00	reconnaissance	(Ramakers et al., 2011)
165_T7P_69	<i>S. citri</i>	MT2 melatonin receptor	AEK32457	<i>Paralichthys olivaceus</i>	8,60E+00	suppresseur d'apoptose	(Drazen et Nelson, 2001)
SSH_T7P_35	<i>M. luteus</i>	apolipoporphins	XP_003491784	<i>Bombus impatiens</i>	4,84E-14	liaison au LPS, LTA, $\beta$ -1,3-glucane	(Halwani et al., 2000)
293_T7P_11	<i>E. coli</i>	tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR1 isoform 2 precursor	NP_001077061	<i>Homo sapiens</i>	2,46E-36	activité kinase	(Jarosch et al., 2005)
SSH_T7P_87	<i>M. luteus</i>	DNA damage-binding protein 1	XP_003395809	<i>Bombus terrestris</i>	1,54E-61	<u>Signalisation</u> maturation des hémocytes	(Takata et al., 2004)
303_T7P_15	<i>S. citri</i>	inhibitor of apoptosis 1	ADK56128	<i>Lygus lineolaris</i>	4,24E-32	régulation de la voie Imd	(Gesellchen et al., 2005)
246_T7P_54	<i>S. citri</i>	trypsin-1	XP_003689751	<i>Apis florea</i>	4,85E-26	activation de la pro-phénoloxidase	(Saul et al., 1987)
161_T7P_42	<i>E. coli</i> <i>M. luteus</i> <i>S. citri</i>	serine protease	XP_001968385	<i>Drosophila erecta</i>	6,32E-11	activation de la pro-phénoloxidase	(Saul et al., 1987)
CIC_61.fa	<i>S. citri</i>	tyrosine 3-monooxygenase	XP_001944964	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	3,11E-10	voie de mélanisation	(Gorman et al., 2007)



### **3. 3. Recherche de gènes d'immunité**

La **figure 25** indique qu'aucune des ESTs parmi les 3 banques soustractives ne présente d'homologie avec les gènes d'immunité classiques codant des effecteurs (lysozyme, peptides antimicrobiens, phénoloxidase), des récepteurs (PGRPs, lectines), ou des intermédiaires des voies Toll et Imd. Ce résultat est surprenant car des processus immunitaires faisant intervenir ces gènes ont été identifiés au niveau du plasma et des hémocytes (activité antibactérienne, activité phénoloxidase, phagocytose). Néanmoins, ce résultat est en accord avec les travaux menés sur le puceron chez qui l'absence de peptides antimicrobiens et de PGRPs suggère une immunité cellulaire et humorale tronquée (Gerardo et al., 2010; Laughton et al., 2011). Aussi, l'ensemble des séquences a été ré-analysé en parallèle d'un travail bibliographique afin d'identifier des gènes codant des protéines ayant potentiellement un rôle immunitaire. Ainsi 23 gènes répartis sur les 3 banques soustractives ont pu être identifiés et classés en fonction de leur rôle potentiel dans la réponse immunitaire (**tab. 3**). Certains de ces gènes codent des protéines pouvant jouer un rôle de récepteur telles que la Protéine ribosomale S7e (Shao et al., 2004), d'intermédiaire de signalisation telles les Heat shock protein (Mayer and Bukau, 2005) ou encore d'effecteurs telles que l'Hémocyanine (Terwilliger, 2007). Parmi tous ces gènes, 6 ont été retenus afin de suivre leur expression au temps précoce d'une infection bactérienne (**tab. 3, en gras**).

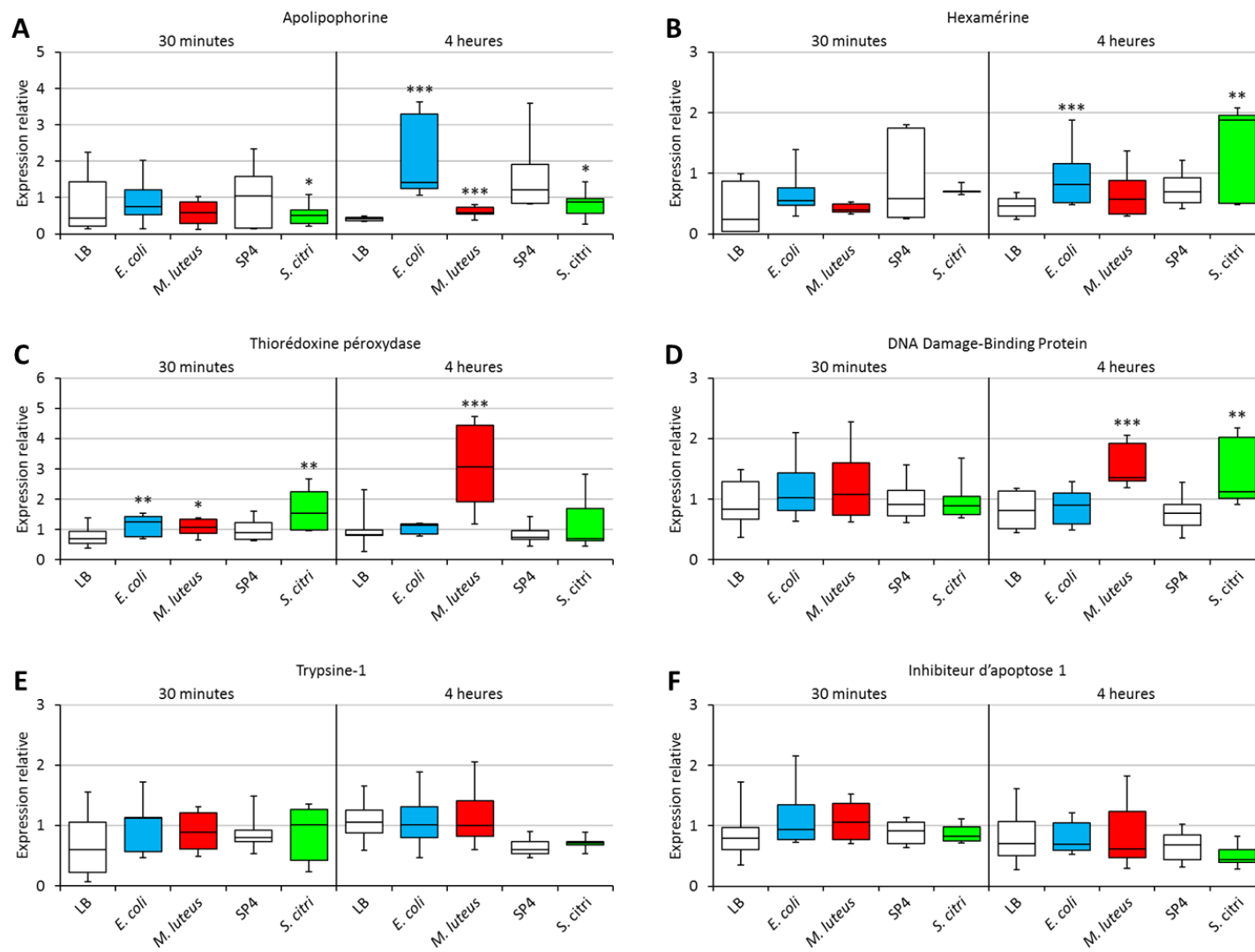
Le premier de ces gènes code l'Apolipophorine. Cette protéine intervient dans le transport de particules lipidiques (Weers and Ryan, 2006) mais serait aussi impliquée dans la réponse immunitaire en favorisant l'élimination de pathogènes telle *Bacillus thuringiensis* par le coléoptère *Tribolium castaneum* (Contreras et al., 2013), *Legionella* par le lépidoptère *Galleria mellonella* (Zdybicka-Barabas et al., 2014) ou encore *Plasmodium berghei* par le diptère *Anopheles gambiae* (Gupta et al., 2010a). En effet l'Apolipophorine lierait des antigènes de surface (LPS, LTA,  $\beta$ -1,3-glucane) et pourrait agir comme un récepteur induisant la phagocytose, l'activation de la Pro-phénoloxidase et la synthèse de peptides antimicrobiens (Halwani et al., 2000; Kim et al., 2004; Toubarro et al., 2013; Whitten et al., 2004). Le gène codant la Trypsine-1 a été choisi car cette protéine pourrait jouer un rôle dans la signalisation de la réponse immunitaire. En effet *in vitro*, la trypsine est capable d'activer la Pro-phénoloxidase en la clivant (Saul et al., 1987). *In vivo*, ce rôle est tenu par des sérines

105_T7P_9	<i>M. luteus</i>	hsp70 family member	ADN29892	<i>Triatoma matogrossensis</i>	2,57E-59	réponse au stress	(Mayer and Bukau, 2005)
116_T7P_20	<i>S. citri</i>	sentrin/sumo-specific protease	XP_002433046	<i>Pediculus humanus corporis</i>	1,05E-30	inhibition de la réponse anti-virale	(Ran et al., 2011)
24_T7P_24	<i>S. citri</i>	digestive cysteine proteinase 2	XP_003384331	<i>Amphimedon queenslandica</i>	3,70E-55	production de peptides antimicrobiens	(Cruz et al., 2010)
383_T7P_95	<i>S. citri</i>	heat shock 90 protein	BAH83702	<i>Diaphorina citri</i>	1,01E-14	réponse au stress	(Mayer and Bukau, 2005)
262_T7P_70	<i>S. citri</i>	heat shock protein 83	XP_003704636	<i>Megachile rotundata</i>	7,52E-70	réponse au stress	(Mayer and Bukau, 2005)
198_T7P_6	<i>S. citri</i> <i>E. coli</i>	GTP cyclohydrolase I	NP_001232962	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	8,96E-66	voie des lectines	(Schott et al., 1993)
<b>Effecteurs</b>							
<b>148_T7P_37</b>	<b><i>M. luteus</i></b>	<b>thioredoxin peroxidase</b>	<b>ACO36036</b>	<b><i>Scylla paramamosain</i></b>	<b>2,22E-37</b>	<b>antioxydant</b>	(Chen et al., 2014)
339_T7P_51	<i>S. citri</i>	arylphorin subunit alpha	XP_001849286	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1,78E-11	activité phénoloxidase	(Glazer et al., 2013)
<b>274_T7P_82</b>	<b><i>S. citri</i> <i>E. coli</i></b>	<b>hexamerin</b>	<b>AAD40236</b>	<b><i>Apis mellifera</i></b>	<b>8,24E-52</b>	<b>activité phénoloxidase</b>	(Glazer et al., 2013)
291_T7P_3	<i>S. citri</i> <i>E. coli</i>	hemocyanin subunit	XP_321436	<i>Anopheles gambiae</i>	7,07E-16	activité phénoloxidase	(Terwilliger, 2007)
286_T7P_92	<i>E. coli</i> <i>M. luteus</i> <i>S. citri</i>	vitellogenin	AAZ06771	<i>Homalodisca vitripennis</i>	7,38E-106	activité antimicrobienne	(Tong et al., 2010)
174_T7P_52	<i>M. luteus</i>	apolipoprotein D	XP_971031	<i>Tribolium castaneum</i>	1,66E-41	réponse au stress	(Muffat et al., 2008)
215_T7P_23	<i>S. citri</i>	histone H3	CAA31968	<i>Medicago sativa</i>	1,23E-16	activité antimicrobienne	(Poirier et al., 2014)

protéases mais il a été montré que la majorité de ces protéines avait une activité enzymatique similaire à la trypsine (Ross et al., 2003). Le gène codant l'Inhibiteur d'apoptose 1 a été retenu comme pouvant intervenir dans la signalisation. Il a été montré chez la drosophile que l'Inhibiteur d'apoptose 2, permettait la translocation nucléaire du facteur de transcription Relish, indispensable pour l'expression du gène codant l'Attacine (Gesellchen et al., 2005; Kleino et al., 2005; Valanne et al., 2007). Aussi le gène codant l'Inhibiteur d'apoptose 1 pourrait jouer un rôle similaire chez *C. haematoceps*. Le gène codant la DNA damage-binding protein 1 (DDBP1) a été choisi car des études menées chez la drosophile ont montré que cette protéine intervenait dans la maturation des hémocytes, dans l'activité phénoloxidase et la synthèse de peptides antimicrobiens (Takata et al., 2004). Les gènes codant la Thiorédoxine peroxydase et l'Hexamérine ont été retenus comme pouvant agir en tant qu'effecteurs. La Thiorédoxine peroxydase est impliquée dans la détoxification au sein de l'organisme en éliminant notamment le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Radyuk et al., 2003). Récemment, il a été montré que cette protéine favorisait la survie de *Spodoptera litura* (lépidoptère) au cours d'une infection fongique (Chen et al., 2014). La Thiorédoxine peroxydase pourrait également intervenir chez *C. haematoceps* dans la réponse à une infection bactérienne. Le choix du gène codant l'Hexamérine s'explique par le lien qui unit cette protéine avec la Phénoloxidase. Ces 2 protéines appartiennent à la famille des Hémocyanines et possèdent donc un ancêtre commun (Burmester, 2002; Burmester and Schellen, 1996). Certaines des protéines appartenant à cette famille, comme l'Hémocyanine de l'écrevisse, présentent une activité phénoloxidase (Glazer et al., 2013). Chez *C. haematoceps*, l'Hexamérine pourrait aussi posséder cette activité et agir en tant qu'effecteur. Cette hypothèse est renforcée par les travaux réalisés sur la blatte *Blaberus discoidalis* chez qui l'Hexamérine semblait intervenir dans l'activité phénoloxidase (Chen et al., 1999).

### **3. 4. Suivi de l'expression de 6 gènes d'intérêt lors de l'infection**

Chez la drosophile, les gènes impliqués dans la signalisation de la réponse immunitaire sont exprimés de manière transitoire (entre 30 minutes et 1 heure après infection) alors que ceux codant les peptides antimicrobiens sont exprimés de manière prolongée (jusqu'à 4 heures après infection) (Boutros et al., 2002; Park et al., 2004; Wei et al., 2009).



**Figure 26 : Profil d'expression des gènes sélectionnés.** Pour chaque gène, le suivi a été réalisé 30 minutes et 4 heures après injection de milieu (LB et SP4) ou de bactéries (*E. coli*, *M. luteus* et *S. citri*). L'expression relative de chaque gène a été calculée en prenant la tubuline- $\beta$  comme gène de référence. Les résultats ont ensuite été normalisés avec ceux obtenus chez des insectes sains. Chaque graphe représente les données de 5 expérimentations indépendantes. Ces données ont fait l'objet d'un test statistique de Student. \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ .

Le suivi de l'expression des gènes d'intérêt a été réalisé par RT-PCR quantitative, aux temps précoces de l'infection, à savoir 30 minutes et 4 heures après injection du milieu de culture (LB ou SP4) ou de  $10^5$  bactéries (*E. coli*, *M. luteus* et *S. citri*). Le taux de transcrits de chaque gène a été quantifié de façon relative avec des amorces spécifiques (**tab. 6, Matériels et Méthodes**). Le gène codant la tubuline- $\beta$  a été choisi comme gène de référence après avoir testé plusieurs gènes de ménage (actine, vitellogénine) et montré que leur expression ne changeait pas en fonction des conditions (insectes sains versus insectes infectés). Les profils d'expression sont présentés dans la **figure 26**.

Parmi les 6 gènes testés, les résultats de RT-PCR quantitative ont montré que ceux codant l'Apolipophorine, l'Hexamérine, la Thiorédoxine peroxydase et la DNA damage-binding protein 1 (DDBP1) présentent une variation d'expression au cours d'une infection bactérienne, contrairement à ceux codant la Trypsine-1 et l'Inhibiteur d'apoptose 1 (**fig. 26E et 26F**).

Les résultats montrent que l'infection par *E. coli* et *M. luteus* induit à 4 heures une surexpression du gène codant l'Apolipophorine par rapport à l'injection de milieu LB (**fig. 26A**). L'infection par *S. citri* entraîne au contraire une sous-expression de ce gène (visible à 30 minutes et 4 heures) en comparaison avec la condition contrôle (injection de milieu SP4). Ces résultats suggèrent que l'Apolipophorine intervient dans la réponse de *C. haematoceps* à l'infection par *E. coli* et *M. luteus*.

Par ailleurs, l'infection par *E. coli* et *S. citri* entraîne à 4 heures une surexpression du gène codant l'Hexamérine par rapport aux conditions contrôles (**fig. 26B**). L'infection par *M. luteus* n'entraîne pas de modification de l'expression de ce gène quel que soit le temps.

Les résultats de RT-PCR quantitative montrent que l'infection par *E. coli*, *M. luteus* et *S. citri* entraîne à 30 minutes une surexpression du gène codant la Thiorédoxine peroxydase (**fig. 26C**). Pour *M. luteus*, la surexpression de ce gène reste visible 4 heures après injection des bactéries.

Enfin, les profils d'expression montrent que l'injection de *M. luteus* et *S. citri* entraîne à 4 heures une surexpression du gène codant la DDBP1 par rapport aux conditions contrôles (**fig. 26D**). En revanche, l'injection d'*E. coli* n'entraîne pas de modification de l'expression de ce gène. Ces résultats suggèrent donc que la DDBP1 intervient dans la réponse de *C. haematoceps* à l'infection par *M. luteus* et *S. citri*.

Pour les gènes codant l'Apolipophorine, l'Hexamérine, la Thiorédoxine peroxydase et la DNA damage-binding protein 1, les résultats de RT-PCR quantitative sont en accord avec les banques soustractives à partir desquels ils ont été isolés (**tab. 3**) et ont permis d'identifier ces gènes comme étant surexprimés lors d'une infection bactérienne. Toutefois, les profils d'expression de ces 4 gènes ne semblent pas être spécifiques du type de bactérie injectée. En effet le gène codant l'Apolipophorine est surexprimé après injection d'*E. coli* mais également après injection de *M. luteus*. Le gène codant la DDBP1 est surexprimé après injection de *M. luteus* mais aussi de *S. citri*. Au final, les résultats obtenus montrent que les gènes codant l'Hexamérine, la DNA damage-binding protein 1 et la Thiorédoxine peroxydase sont surexprimés précocement lors de l'infection par *S. citri* et suggèrent donc que ces protéines jouent un rôle dans la réponse de *C. haematoceps* à l'infection par les spiroplasmes.

À l'issue de ces travaux, le système immunitaire de *C. haematoceps* apparaît comme étant fonctionnel. Les principaux types d'hémocytes circulants ont pu être identifiés. Les plasmacytes et les granulocytes sont capables d'adhérer, de phagocyter des bactéries et de former des nodules. Les expériences d'inhibition de croissance ont mis en évidence la présence d'effecteurs plasmatiques ayant une activité antibactérienne efficace contre *M. luteus*. Une activité phénoloxidase a également été mise en évidence au niveau des hémocytes adhérents et du plasma. Afin d'identifier les gènes impliqués dans ces différents processus immunitaires, une approche par d'hybridation soustractive a été utilisée. Bien que les séquences obtenues ne présentent pas d'homologie avec des gènes d'immunité classiques (peptides antimicrobiens, voie Toll et Imd...), les expériences de RT-PCR quantitative ont permis d'identifier 4 gènes qui sont activés au cours d'une infection bactérienne.

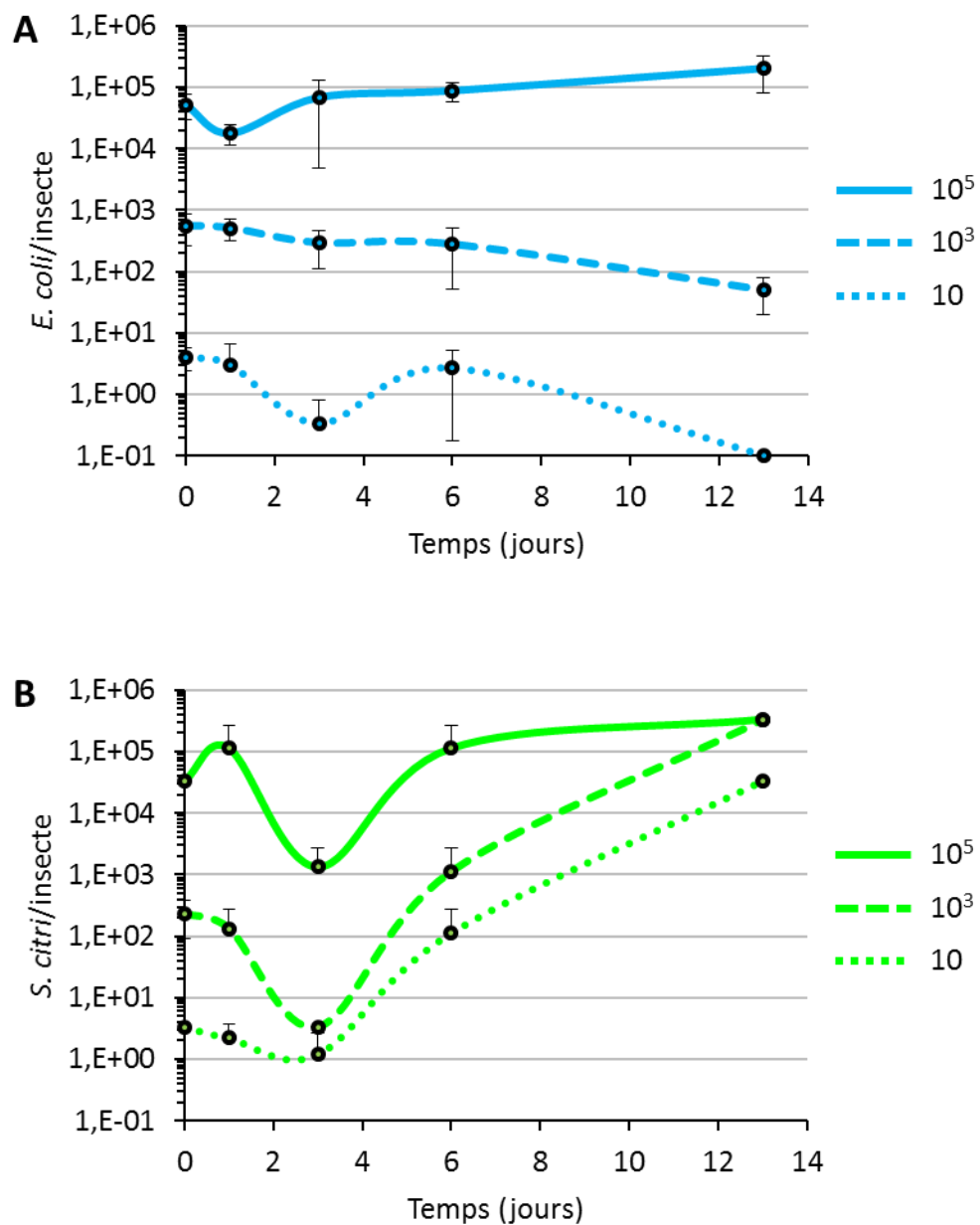
## II. Etude de la réponse immunitaire à l'infection par *S. citri*

De nombreux travaux ont été réalisés pour comprendre les mécanismes de la transmission de *S. citri* par *C. haematoceps* (Berho et al., 2006b; Béven et al., 2012; Boutareaud et al., 2004; Breton et al., 2010; Duret et al., 2003, 2010a, 2014; Killiny et al., 2005, 2006; Kwon et al., 1999a; Labroussaa et al., 2010, 2011; Liu, 1983). Néanmoins, l'interaction entre ces bactéries et le système immunitaire des cicadelles n'a jamais été étudiée auparavant. Certains travaux menés chez la drosophile suggèrent que les bactéries du genre *Spiroplasma*, y compris *S. citri*, ne seraient pas reconnues par le système immunitaire de l'insecte (Anbutsu and Fukatsu, 2010; Herren and Lemaitre, 2011; Hurst et al., 2003). Cependant, les résultats obtenus chez *C. haematoceps* semblent indiquer que le système immunitaire de la cicadelle serait différent de celui de la drosophile. Aussi notre objectif a été d'étudier le rôle des composantes cellulaire et humorale dans la réponse de *C. haematoceps* à une infection par *S. citri*. Nous avons également comparé cette réponse à celle mise en place lors d'une infection par *E. coli* et *M. luteus*.

### 1. Suivi de la croissance bactérienne

Le suivi de la croissance bactérienne dans l'insecte a été réalisé pour comparer la croissance de *S. citri* à celle d'une bactérie non-pathogène, *E. coli* TOP10 (Boutareaud et al., 2004; Markham, 1983; Whitcomb et al., 1973). Pour cela, différentes quantités de bactéries *E. coli* et *S. citri* ( $10^5$ ,  $10^3$  et  $10^1$ ) ont été injectées dans la cicadelle et leur multiplication a été mesurée pendant 13 jours (**voir Matériels et Méthodes, paragraphe 1. 3**).

Pour *E. coli*, chacune des conditions d'injection donnent des courbes de croissance avec des profils différents. Seul l'inoculum de  $10^5$  bactéries permet à *E. coli* de se maintenir dans l'insecte, soit en moyenne  $2.10^5$  bactéries/insecte au 13<sup>ème</sup> jour (**fig. 27A**). Avec un inoculum plus faible ( $10^3$  bactéries), la charge bactérienne diminue au cours du temps pour atteindre des titres de  $5.10^1$  bactéries/insecte et tendre vers la résolution de l'infection. Enfin aucunes des  $10^1$  bactéries injectées ne sont retrouvées après 13 jours dans l'insecte.



**Figure 27 : Suivi de la charge bactérienne dans *C. haematoceps*.** Les insectes ont subi une injection de différentes quantités ( $10^5$ ,  $10^3$  et  $10^1$ ) d'*E. coli* (A) et de *S. citri* (B), et la charge bactérienne a été suivie entre 30 minutes (T0) et 13 jours après injection. Chaque courbe représente la moyenne  $\pm$  SD de 3 expérimentations indépendantes

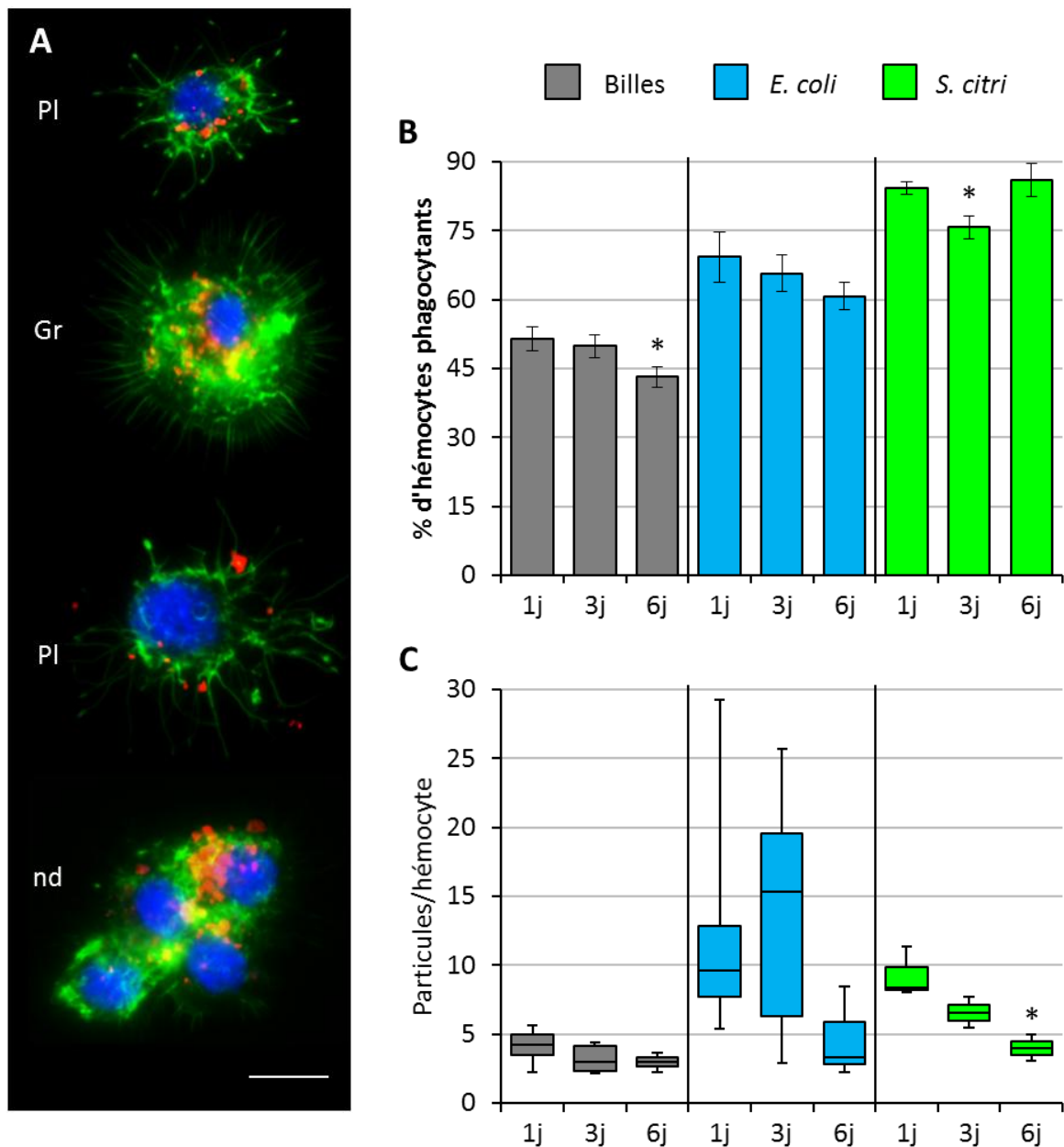


Pour *S. citri*, les profils des courbes de croissances sont similaires pour les trois conditions d'injection (**fig. 27B**). Dans les premières 24 heures le nombre de spiroplasmes reste à peu près stable avant de chuter (observé au 3<sup>ème</sup> jour) de 2 logs et 1,5 log pour un inoculum de 10<sup>5</sup> et 10<sup>3</sup> spiroplasmes respectivement. Pour un inoculum de 10<sup>1</sup> spiroplasmes en revanche, seule une diminution d'un facteur 2 est observée. Pour chaque condition, cette chute est suivie d'une augmentation de la charge bactérienne de 2,5 logs pour l'inoculum à 10<sup>5</sup> spiroplasmes, 5 logs pour l'inoculum à 10<sup>3</sup> spiroplasmes et 4,5 logs pour l'inoculum à 10<sup>1</sup> spiroplasmes. La variation de la charge bactérienne, observée entre le 1<sup>er</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour d'infection peut s'expliquer par l'adaptation de *S. citri* au nouvel environnement que représente l'hémolymphe mais également par la mise en place d'une réponse immunitaire efficace de l'insecte. Cependant la forte multiplication qui suit, suggère que cette réponse n'est pas suffisante et qu'elle pourrait être contournée par le spiroplasma.

## **2. Phagocytose de *S. citri***

Les travaux menés sur la caractérisation de la composante cellulaire ont montré que les hémocytes adhérents de *C. haematoceps* étaient capables de phagocyter des billes de latex, des bactéries *E. coli* et de former des nodules (**fig. 22**). Afin d'étudier cette réponse cellulaire dans le cadre d'une infection par *S. citri*, la phagocytose des spiroplasmes a été suivie à différents temps (1, 3 et 6 jours) après injection de 10<sup>5</sup> spiroplasmes. Cette expérience a également été réalisée après injection d'*E. coli* et de billes de latex à titre de témoins (**voir Matériels et Méthodes, paragraphe 3. 2**).

Les observations en microscopie à épifluorescence ont montré que des spiroplasmes étaient présents dans le cytoplasme des granulocytes et des plasmatocytes (**fig. 28A**) ainsi qu'au niveau des filopodes des plasmatocytes. De nombreux nodules tels que celui montré dans la **figure 28A** ont aussi été observés. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec *E. coli*. Néanmoins, l'estimation du pourcentage d'hémocytes phagocytants au cours de l'infection a mis en évidence des différences entre la phagocytose de *S. citri* et celles d'*E. coli* et des billes de latex.

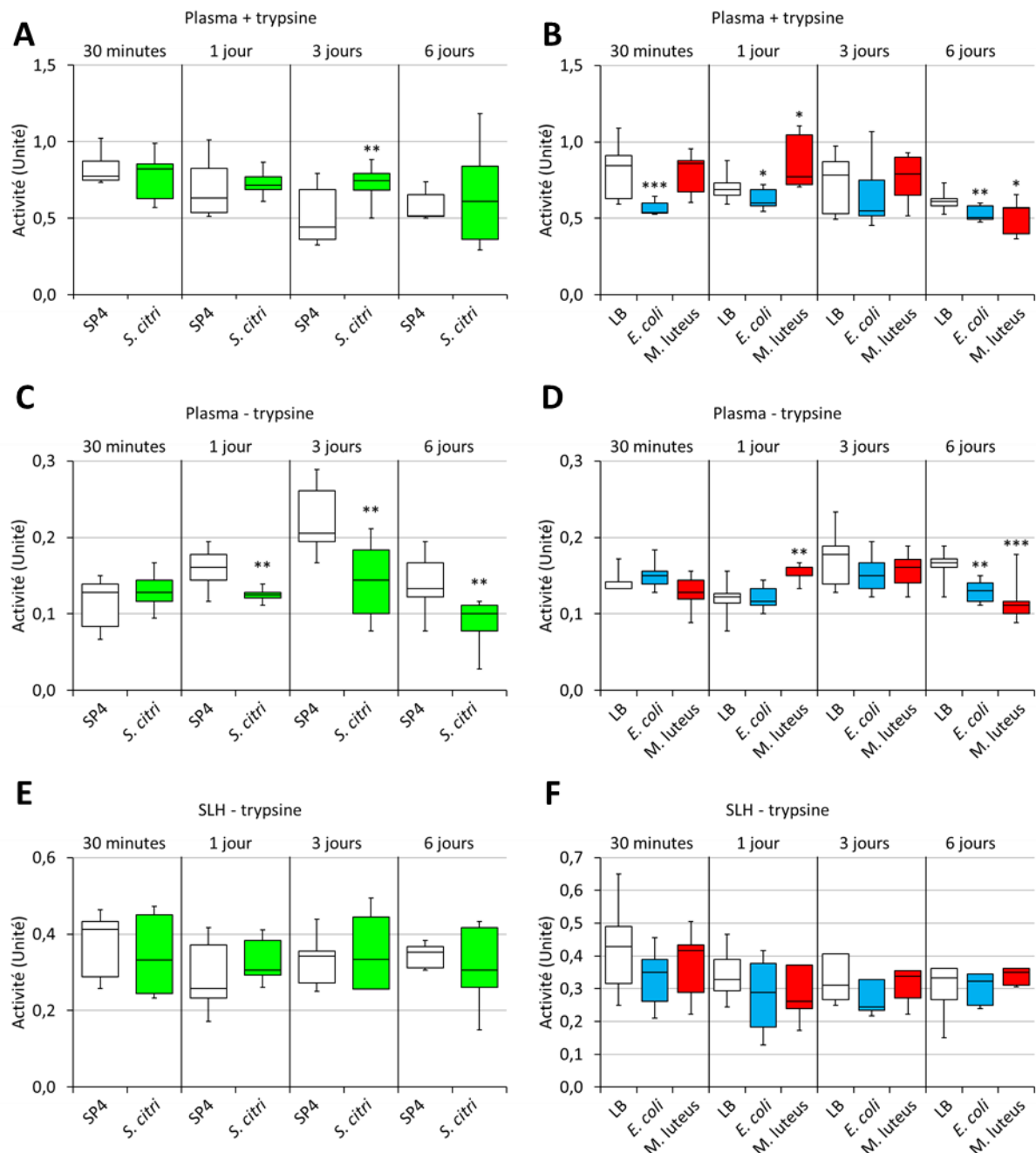


**Figure 28: Suivi de la phagocytose au cours du temps.** (A) Phagocytose de *S. citri* par les hémocytes, 24 heures après injection. L'actine (vert) et les noyaux (bleu) ont été marqués comme dans la figure 21 ; les spiroplasmes ont été marqués à l'aide d'anticorps primaires de lapin anti-*S. citri* GII3 et d'anticorps secondaires couplés à l'Alexa-488 et ont été colorés en rouge. (B) Estimation du nombre d'hémocytes phagocytants et (C) du nombre de particules phagocytées (billes ou bactéries). Les hémocytes ont été observés en microscopie à épifluorescence 1, 3 et 6 jours après injection de  $10^5$  billes de latex (en gris), d'*E. coli* (en bleu) et de *S. citri* (en vert). Le pourcentage d'hémocytes phagocytants et le nombre de particules phagocytées ont été calculés à partir de 100 champs de microscopie. Chaque histogramme (B) et graphe (C) représente les données de 3 expérimentations indépendantes. Ces données ont fait l'objet d'un test statistique de Student. ( $p < 0,05$ ).

Les résultats montrent qu'à 1 jour et 3 jours après injection, 50% des hémocytes ont phagocytés des billes (**fig. 28B**). Six jours après injection des billes, le taux de phagocytose diminue de façon significative (43%). Ce résultat n'est pas étonnant dans la mesure où les billes ne se multiplient pas et ne sont pas éliminées lors de la phagocytose. Concernant *E. coli*, les résultats obtenus montrent que le pourcentage d'hémocytes phagocytants est plus élevé, soit 65% en moyenne. Toutefois une diminution non-significative mais visible est également observée au cours du temps. Pour *S. citri*, le nombre d'hémocytes phagocytant est plus élevé, soit 80% en moyenne, et ne montre une diminution significative qu'au 3<sup>ème</sup> jour.

En parallèle, le nombre de particules (billes de latex et bactéries) phagocytées par les hémocytes a également été estimé. Les résultats montrent qu'au cours du temps, le nombre de billes phagocytées est stable, soit de 4 à 3 billes/hémocyte (**fig. 28C**) et confirment que ces particules ne sont pas dégradées par la phagocytose. Des valeurs similaires ont été obtenues notamment chez *Manduca sexta* (Dean et al., 2004). Concernant *E. coli*, le nombre de bactéries par hémocyte varie fortement au cours du temps, soit en moyenne 9 bactéries/hémocyte à 1 jour, 15 bactéries/hémocyte à 3 jours et 3 bactéries/hémocytes à 6 jours. Ces valeurs sont supérieures à celles observées avec les billes de latex et suggèrent que les bactéries *E. coli* sont davantage reconnues par les hémocytes. D'autre part, l'augmentation du nombre de bactéries par hémocyte entre 1 et 3 jours semble être corrélée à la multiplication bactérienne observée dans les insectes pour ces mêmes temps (**fig. 27A, inoculum à 10<sup>5</sup>**). En revanche, la forte diminution du nombre de bactéries par hémocyte au jour 6 n'est pas en accord avec la charge bactérienne observée et suggère une réduction importante de l'efficacité de la phagocytose favorisant le maintien d'*E. coli* dans l'insecte.

Pour *S. citri*, les résultats montrent que le nombre de spiroplasmes par hémocyte diminue au cours du temps, passant en moyenne de 9 spiroplasmes/hémocyte à 1 jour, à 4 spiroplasmes/hémocytes à 6 jours. Ces résultats ne sont pas corrélés avec la croissance bactérienne de *S. citri* dans l'insecte (**fig. 27B, inoculum à 10<sup>5</sup>**). Cette diminution de l'efficacité de phagocytose pourrait permettre au spiroplasmes de se multiplier et représenterait un mécanisme de contournement de la réponse cellulaire.



**Figure 29:** Suivi de l'activité phénoloxidase dans le plasma et le SLH 1, 3 et 6 jours après injection d'*E. coli*, *M. luteus* et *S. citri*. (A, C et E) Suivi de l'activité après injection de milieu SP4 ou  $10^5$  spiroplasmes et (B, D et F) après injection de milieu LB ou de  $10^5$  bactéries *E. coli* et *M. luteus*. Pour le plasma, l'activité phénoloxidase a été mesurée présence et absence de trypsine (1 mg/ml). Pour le SLH, l'activité phénoloxidase a seulement été mesurée en absence de trypsine. Chaque graphe représente les données de 3 expérimentations indépendantes. Ces données ont fait l'objet d'un test statistique de Student. \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$

### **3. Activité phénoloxidase au cours de l'infection par *S. citri***

L'analyse des banques soustractives n'a pas permis d'identifier de gène codant la Pro-phénoloxidase. Les expériences menées sur le plasma et les hémocytes ont pourtant révélé la présence d'une activité phénoloxidase (**fig. 18 et 23**). Pour étudier le rôle de cette enzyme dans la réponse à *S. citri*, son activité a été mesurée dans le plasma et le surnageant de lysat hémocytaire (SLH) au cours de l'infection (30 min, 1, 3 et 6 jours). Les insectes ayant subi une injection de milieu SP4 ont servi de contrôle. La même expérience a été réalisée avec *E. coli* et *M. luteus*, et l'injection de milieu LB a servi de contrôle pour ces 2 bactéries.

Dans le plasma en présence de trypsine, les résultats montrent qu'au cours de l'infection par *S. citri*, l'activité phénoloxidase est stable soit 0,72 en moyenne (**fig. 29A**). A 3 jours, elle est supérieure à celle des insectes contrôles (0,74 contre 0,44) chez qui l'activité phénoloxidase diminue fortement. Ce résultat suggère que l'infection par *S. citri* entraîne une production transitoire de Pro-phénoloxidase dans le plasma. Après injection d'*E. coli*, l'activité phénoloxidase est inférieure à celle des insectes contrôles, soit 0,55 en moyenne contre 0,73 (**fig. 29B**). Ce résultat suggère que l'infection par *E. coli* n'entraîne pas de production de Pro-phénoloxidase dans le plasma. Les résultats obtenus avec *M. luteus* sont différents. Au temps 1 jour, l'activité mesurée est supérieure à celle des insectes contrôles, soit 0,75 contre 0,69 (**fig. 29B**), mais à 6 jours elle est devenue inférieure (0,57 contre 0,61). Ce résultat suggère que l'infection par *M. luteus* induit une production de Pro-phénoloxidase dans le plasma. La diminution de l'activité, mesurée à 6 jours, montre que cette production est aussi transitoire.

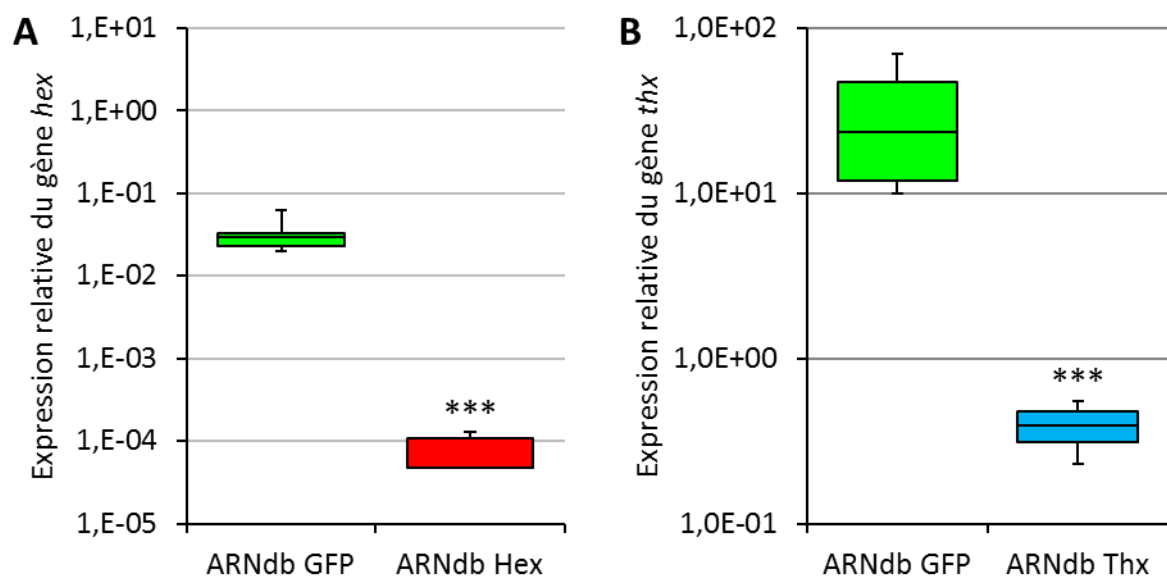
En absence de trypsine, l'injection de milieu SP4 entraîne une augmentation de l'activité phénoloxidase entre 30 min et 3 jours après injection, soit 0,13 et 0,21 (**fig. 29C**). En revanche, l'injection des spiroplasmes n'induit pas cette augmentation. Entre 1 et 6 jours après injection des spiroplasmes, l'activité phénoloxidase est alors inférieure à celle des insectes contrôles. L'injection d'*E. coli* n'entraîne aucune modification de l'activité phénoloxidase dans le plasma, sauf à 6 jours où elle est inférieure à celle mesurée chez les insectes contrôles (0,14 contre 0,17) (**fig. 29D**). Pour *M. luteus* les résultats sont similaires à ceux obtenus en présence de trypsine, à savoir une forte activité à 1 jour puis une inhibition à 6 jours. Au niveau du SLH, les résultats indiquent qu'aucune des bactéries n'entraîne de modification de l'activité phénoloxidase par rapport aux insectes contrôle (**fig. 29E et F**).

Le suivi de l'activité phénoloxidase au cours d'une infection bactérienne a mis en évidence des différences de réponse dans le plasma en fonction de la bactérie injectée. Concernant *M. luteus*, les activités mesurées en présence et absence de trypsine suggèrent que chez *C. haematoceps* cette bactérie induit une réponse de type phénoloxidase, contrairement à *E. coli*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur le moustique *Armigeres subalbatus* chez qui la mélanisation via la phénoloxidase intervient dans l'élimination de *M. luteus* mais pas d'*E. coli*. Concernant *S. citri*, les résultats sont différents. L'infection entraînerait une réponse de type phénoloxidase qui serait inhibée par *S. citri* au cours d'un processus d'échappement. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres pathogènes d'insectes notamment chez la drosophile où une serpène produite par la guêpe endoparasitoïde *Leptopilina boulardi* inhibe l'activité phénoloxidase (Colinet et al., 2009).

#### **4. Etude fonctionnelle des gènes *hex*, *ddb1* et *thx* lors de l'infection.**

Les expériences de RT-PCR quantitative ont montré que les gènes codant l'Hexamérine, la DNA damage-binding protein 1 (DDBP1) et la Thiorédoxine peroxydase étaient surexprimés lors de l'infection par *S. citri* (**fig. 26**). Pour étudier le rôle de ces gènes dans la survie de la cicadelle face à l'infection par *S. citri* et dans le contrôle de la charge bactérienne, une approche fonctionnelle d'interférence par ARN a été choisie.

Les insectes ont subi une injection d'ARN double brin spécifique du gène d'intérêt ou d'un gène exogène (GFP) en guise de contrôle. Après avoir vérifié par RT-PCR quantitative que l'injection de l'ARNdb entraînait une diminution significative de l'expression du gène d'intérêt, les insectes ont subi une injection de  $10^3$  spiroplasmes ou de milieu SP4. La charge bactérienne et la survie des insectes ont été suivies pendant 13 jours (**voir Matériels et Méthodes, paragraphe 2. 5**). Le choix de l'inoculum s'explique par les résultats du suivi de la croissance bactérienne de *S. citri* dans l'insecte montrant que la plus forte multiplication était observée en injectant  $10^3$  spiroplasmes (5 log entre le 3<sup>ème</sup> et le 13<sup>ème</sup> jour d'infection) (**fig. 27B**). Cette forte multiplication pourrait alors avoir un effet délétère sur la survie de la cicadelle et permettrait d'avoir un phénotype visible. En effet, il a été suggéré que la pathogénicité des spiroplasmes au niveau de leur hôte était essentiellement causée par leur importante multiplication (Herren and Lemaitre, 2011; Whitcomb and Williamson, 1975).



**Figure 30 : Contrôle de l'efficacité de l'interférence par ARN par RT-PCR quantitative.** (A) Quantification relative des transcrits du gène codant l'Hexamérine, 6 jours après injection des ARNdb Hex. (B) Quantification relative des transcrits du gène codant la Thiorédoxine peroxydase, 6 jours après l'injection des ARNdb Thx. Chaque graphe représente les données de 5 expérimentations indépendantes. Ces données ont fait l'objet d'un test statistique de Student. \*\*\*,  $p < 0,001$

#### **4. 1. Efficacité de l'interférence par ARN**

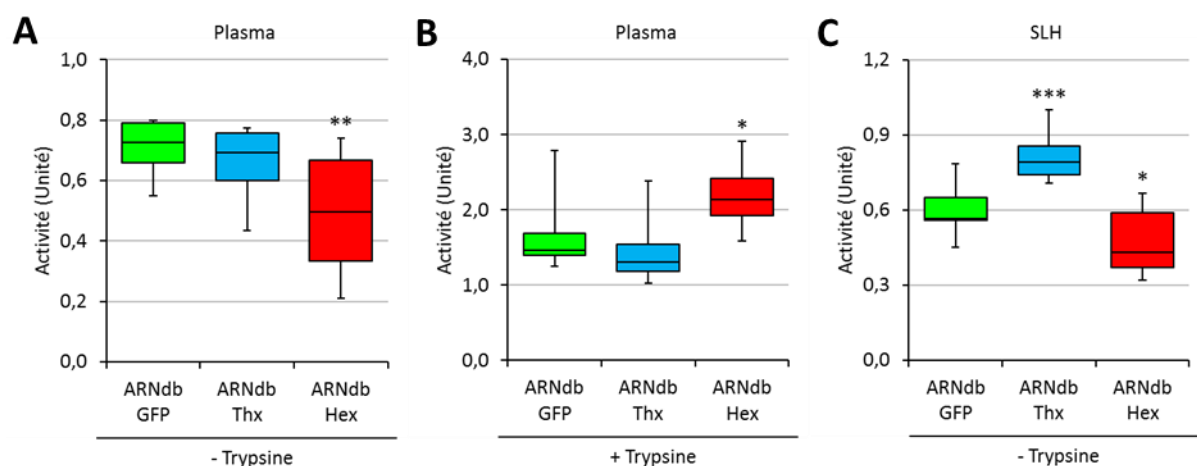
Le taux de transcrits du gène ciblé a été quantifié de façon relative par RT-PCR quantitative, 6 jours après l'injection de l'ARN double brin (ARNdb). L'injection de l'ARNdb ciblant le gène exogène codant la GFP a servi de contrôle afin d'évaluer la spécificité de l'interférence par ARN. Pour le gène de la DNA damage-binding protein 1, la synthèse d'un ARNdb spécifique du gène *ddbp1* n'a pu être obtenue. Aussi, les expériences prévues pour ce gène ont été suspendues. Six jours après l'injection de l'ARNdb Hex, la quantification des ARNm du gène *hex* a montré une diminution d'un facteur 500 de l'expression du gène codant cette protéine par rapport à la condition contrôle (injection d'ARNdb GFP) (**fig. 30A**). Une diminution d'un facteur 50 a été observée 10 jours après l'injection d'ARNdb. Pour le gène *thx* codant la Thiorédoxine peroxydase, l'injection de l'ARNdb Thx a induit une inhibition d'un facteur 40 (**fig. 30B**).

Cette importante réduction du taux de transcrits des gènes *hex* et *thx* montrent nettement l'efficacité de l'approche d'interférence par ARN chez *C. haematoceps*.

#### **4. 2. Mesure de l'activité phénoloxidase après injection d'ARNdb Hex et Thx**

Avant d'étudier la survie de la cicadelle face à l'infection par *S. citri*, l'approche d'interférence par ARN a été utilisée pour vérifier si l'Hexamérine jouait un rôle dans l'activité phénoloxidase comme le laissait supposer son appartenance à la famille des Hémocyanines, comprenant entre autre la Pro-phénoloxidase (Burmester, 2001, 2002; Burmester and Schellen, 1996; Burmester et al., 1998). Pour cela, l'activité phénoloxidase a été mesurée dans le plasma et les hémocytes (SLH), 6 jours après injection d'ARNdb Hex et GFP (contrôle exogène). À ce jour, la Thiorédoxine peroxydase n'a pas été décrite comme pouvant intervenir dans l'activité phénoloxidase. Aussi la même expérience a été réalisée chez des insectes ayant subi une injection d'ARNdb Thx (contrôle endogène).

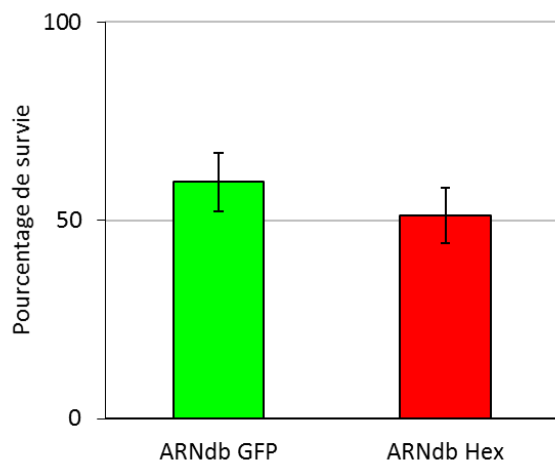




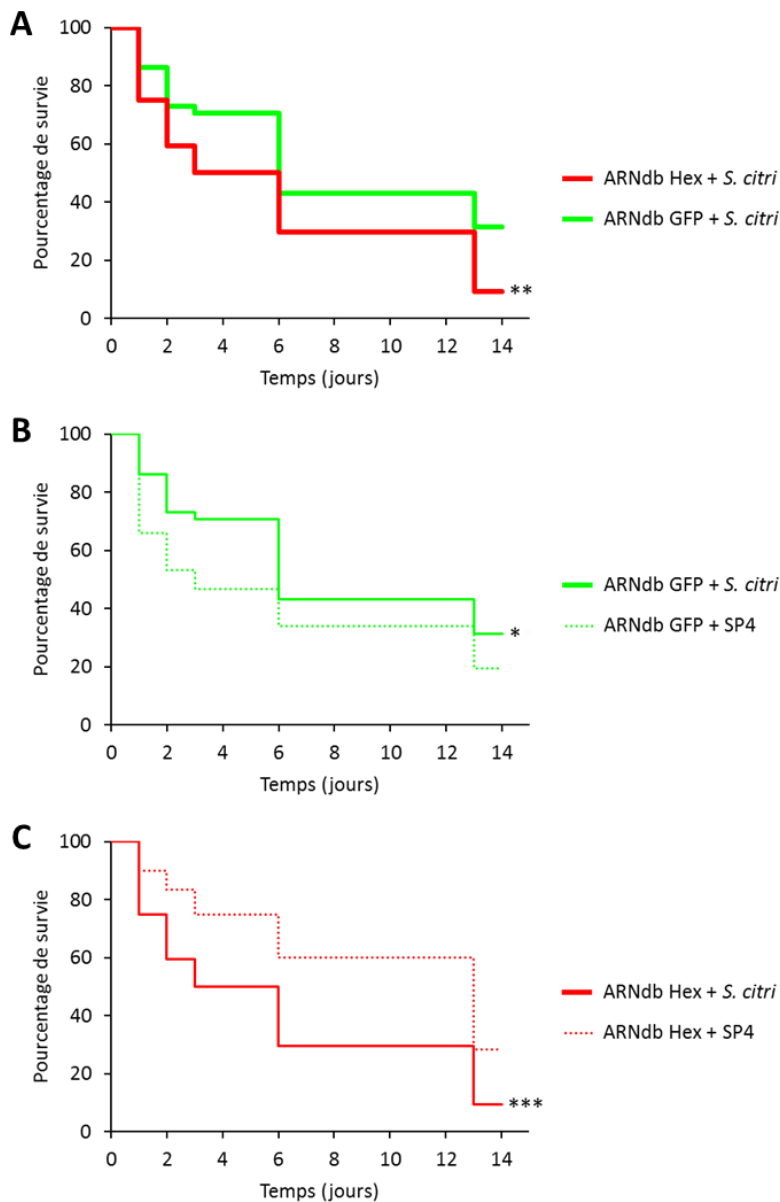
**Figure 31** : Mesure de l'activité phénoloxidasé après injection des ARNdb GFP, Thx et Hex. L'activité phénoloxidasé a été mesurée dans le plasma (A et B) et le SLH (C) en absence (A et C) et présence (B) de trypsine (1 mg/ml), chez des insectes ayant subi une injection d'ARNdb GFP, Thx ou Hex, 6 jours auparavant. Chaque graphe représente les données de 3 expérimentations indépendantes. Ces données ont fait l'objet d'un test statistique de Student. \*\*\*,  $p < 0,001$  ; \*\*,  $p < 0,01$  ; \*,  $p < 0,05$ .

Lorsque les insectes ont été injectés avec l'ARNdb Thx, les activités phénoloxidase mesurées dans le plasma en présence ou absence de trypsine, étaient les mêmes que celles des insectes injectés avec l'ARNdb GFP (**fig. 31**). Dans le SLH, l'activité était significativement supérieure, soit 0,79 contre 0,56. En revanche, l'activité phénoloxidase dans le plasma et le SLH était significativement plus faible chez les insectes injectés avec l'ARNdb Hex que chez les insectes contrôles, soit 0,49 et 0,43 contre 0,73 et 0,57 (**fig. 31A et B**). En présence de trypsine, l'activité phénoloxidase dans le plasma était plus importante chez les insectes injectés avec l'ARNdb Hex que chez les insectes contrôle (**fig. 31C**). Ce résultat surprenant pourrait être un artefact. En effet, l'Hexamérine étant l'une des protéines les plus abondantes dans le plasma des insectes, sa présence dans les échantillons des insectes contrôles pourrait entraîner une titration de la trypsine, perturbant ainsi l'activation maximale de la Pro-phénoloxidase. L'inhibition du gène codant l'Hexamérine chez les insectes injectés avec l'ARNdb Hex pourrait réduire ce phénomène de titration et favoriser l'activation de la Pro-phénoloxidase par la trypsine. Néanmoins la présence d'une activité malgré l'injection de l'ARNdb Hex, indique que l'Hexamérine n'est pas la seule protéine impliquée dans l'activité phénoloxidase.

Les résultats obtenus dans le plasma et le SLH des insectes injectés avec l'ARNdb Hex suggèrent fortement que l'Hexamérine serait impliquée dans l'activité phénoloxidase dans le plasma et les hémocytes. Après l'injection de l'ARNdb Thx, l'absence de modification de l'activité phénoloxidase dans le plasma a confirmé que la Thiorédoxine peroxydase n'intervenait pas dans l'activité phénoloxidase du plasma. En revanche les résultats obtenus dans le SLH suggèrent que cette protéine régule négativement l'activité phénoloxidase dans les hémocytes. Ce résultat pourrait s'expliquer par le rôle la Thiorédoxine peroxydase dans l'élimination des ROS produits dans les hémocytes, notamment lors de la production de mélanine par la phénoloxidase (Radyuk et al., 2003). Au vu de ces résultats et pour des raisons de délais insuffisants, seul le rôle de l'Hexamérine dans la réponse à l'infection par *S. citri* a été étudié.



**Figure 32 :** Estimation de la survie 6 jours après injection des ARNdb GFP et Hex. Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  SD de 5 expérimentations indépendantes. Ces données ont fait l'objet d'un test statistique de Student.  $p > 0,05$ .



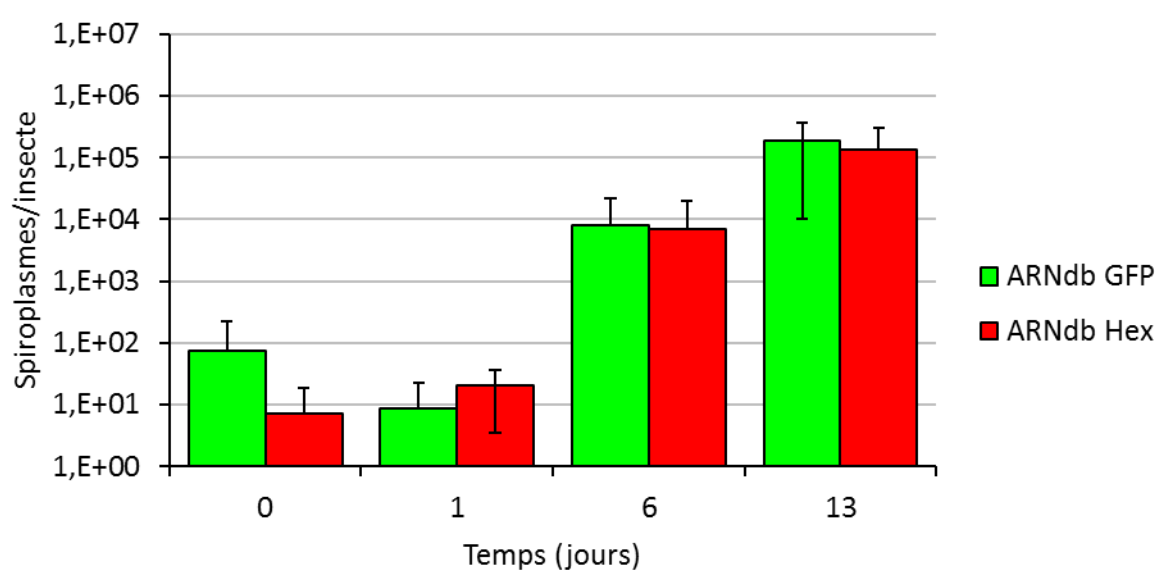
**Figure 33 :** Suivi de la survie après injection de *S. citri* ou de milieu SP4. Le suivi de la mortalité a été réalisé pendant 13 jours, après injection de  $10^3$  spiroplasmes (A) et de milieu SP4 (B et C) chez des insectes ayant subi une injection d'ARNdb Hex ou GFP, 6 jours auparavant. Les courbes de survies ont été réalisées à partir de 5 répliquats biologiques en utilisant la représentation de Kaplan-Meier. Les données ont ensuite été analysées avec un test statistique du log-rank. \*\*\*,  $p < 0,001$  ; \*\*,  $p < 0,01$  ; \*,  $p < 0,05$ .

#### **4. 3. Suivi de la survie à l'infection par *S. citri* après injection d'ARNdb Hex.**

Afin de savoir si l'Hexamérine joue un rôle dans la réponse immunitaire de *C. haematoceps* à l'infection par *S. citri*, le suivi de la survie a été réalisé après injection de spiroplasmes chez des insectes ayant subi une injection d'ARNdb Hex, 6 jours auparavant. Afin de s'assurer que les résultats obtenus étaient bien dus à l'infection par *S. citri*, la survie des insectes a également été suivie après injection de milieu SP4. La même expérience a été réalisée chez des insectes ayant subi une injection d'ARNdb GFP. Cette condition contrôle permet de vérifier que la survie observée est bien corrélée au niveau d'expression du gène codant l'Hexamérine.

Dans un premier temps, seule la survie des insectes après injection des différents ARNdb a été estimée. Les résultats montrent que l'ARNdb Hex entraîne une survie de  $50\% \pm 10\%$ , 6 jours après injection contre  $60\% \pm 10\%$  pour l'ARNdb GFP (**fig. 32**). L'absence de différence significative indique que l'injection d'ARNdb Hex ou GFP fragilise les insectes de la même manière. Le suivi de la mortalité a ensuite été réalisé après l'injection de  $10^3$  spiroplasmes.

Les résultats sont présentés sur la **figure 33** et indiquent que la survie suite à l'infection par *S. citri* est significativement plus faible chez les insectes ayant subi une injection d'ARNdb Hex que chez les insectes ayant subi une injection d'ARNdb GFP (**fig. 33A**). De plus chez ces derniers, la mortalité observée n'est pas liée à l'injection de *S. citri*. En effet, l'injection de milieu SP4 entraîne une mortalité supérieure à celle observée avec *S. citri* (**fig. 33B**). La survie des insectes injectés avec l'ARNdb Hex est significativement plus faible suite à l'injection de *S. citri* qu'avec l'injection de milieu SP4 (**fig. 33C**). Ces résultats montrent donc que l'Hexamérine est impliquée dans la survie de *C. haematoceps* face à l'infection par *S. citri* et appuient l'hypothèse selon laquelle cette protéine intervient dans la réponse immunitaire de la cicadelle face au spiroplasme.



**Figure 34 :** Suivi de la charge bactérienne dans l'insecte au cours du temps dans les insectes ayant été injectés avec l'ARNdb GFP et Hex interférent au préalable. Le suivi de la charge bactérienne a été réalisé après injection de  $10^3$  spiroplasmes chez des insectes ayant subi une injection d'ARNdb Hex ou GFP, 6 jours auparavant. Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  SD de 3 expérimentations indépendantes. Ces données ont fait l'objet d'un test statistique de Student.

#### **4. 4. Suivi de la croissance bactérienne de *S. citri* après injection d'ARNdb Hex.**

En absence d'infection, l'injection d'ARNdb Hex a entraîné une réduction de l'activité phénoloxidase au niveau du plasma et du SLH (**fig. 31**). Nos expériences ont également montré que l'Hexamérine était impliquée dans la survie de *C. haematoceps* face à l'infection par *S. citri*. Ces éléments laissent donc penser que l'Hexamérine pourrait jouer un rôle dans la réponse immunitaire dirigée contre *S. citri*. Aussi, la croissance bactérienne de *S. citri* a été suivie pendant 13 jours chez des insectes ayant subi une injection d'ARNdb Hex ou GFP, 6 jours avant l'injection des spiroplasmes.

Les résultats montrent que la croissance bactérienne de *S. citri* est similaire entre les insectes ayant subi une injection d'ARNdb Hex ou GFP excepté en début d'infection (**fig. 34**). En effet entre le T0 et le 1<sup>er</sup> jour, la quantité de spiroplasmes reste stable chez les insectes injectés avec l'ARNdb Hex alors qu'elle diminue de 1 log chez les insectes contrôles. Néanmoins l'absence d'effet significatif de l'ARNdb Hex suggère que l'Hexamérine n'intervient pas dans le contrôle de la charge bactérienne de *S. citri* dans la cicadelle au long terme. À ce titre et malgré son rôle dans l'activité phénoloxidase, le gène de l'Hexamérine semble être davantage un gène impliqué dans la tolérance de *C. haematoceps* face à *S. citri* qu'un gène d'immunité.



# **Discussion générale**



L'étude de la transmission de *S. citri* par *C. haematoceps* a fait l'objet de nombreux travaux. La pathogénicité de cette bactérie a surtout été décrite chez la plante car aucun symptôme n'est visible chez l'insecte. C'est cette tolérance face à *S. citri* qui a orienté le laboratoire vers l'étude des mécanismes liés à la survie de la cicadelle. Au cours de ma thèse, j'ai donc étudié l'interaction entre le système immunitaire de *C. haematoceps* et la bactérie *Spiroplasma citri*. Le but de ce travail était de caractériser la réponse immunitaire de *C. haematoceps* lors de l'infection par *S. citri* et de comprendre comment le spiroplasme parvient à se maintenir dans l'insecte. La caractérisation du système immunitaire de *C. haematoceps* a permis d'identifier des composantes humorale et cellulaire capables d'intervenir efficacement lors d'une infection bactérienne. L'approche par hybridation soustractive associée à des expériences de RT-PCR quantitative a mis en évidence 4 gènes de *C. haematoceps* pouvant intervenir lors de l'infection par *S. citri*. L'étude fonctionnelle via une approche d'interférence par ARN a montré que le gène codant l'Hexamérine intervenait dans l'activité phénoloxidase ainsi que dans la survie de *C. haematoceps* lors de l'infection par *S. citri*.

## **I. Le Système immunitaire de *C. haematoceps***

### **1. La composante humorale**

#### **1. 1. Activité antibactérienne**

Le but des expériences réalisées dans cette partie était de mettre en évidence la présence d'effecteurs plasmatiques pouvant avoir une activité antibactérienne tel que cela avait déjà été fait chez d'autres insectes (Nimmo et al., 1997; Sumida et al., 1992).

Les tests d'inhibition de croissance ont montré qu'une infection par *E. coli* ou *M. luteus* induisait la production d'un ou plusieurs effecteurs plasmatiques ayant une activité antibactérienne sur *M. luteus*. Aucune activité antibactérienne n'a cependant été observée sur *E. coli*. Ces observations sont en accord avec le suivi de la charge bactérienne dans *C. haematoceps*. En effet, des résultats préliminaires avaient montré que contrairement à *E. coli*, la bactérie *M. luteus* était incapable de se maintenir plus de 24 heures dans l'insecte.

La nature de ces effecteurs n'a pas pu être déterminée mais l'analyse des banques soustractives de *C. haematoceps* suggère qu'il ne s'agit pas de peptides antimicrobiens déjà connus. L'analyse d'une banque d'ESTs de la cicadelle *Euscellidius variegatus* (vecteur expérimental du phytoplasme de la Flavescence dorée) réalisée en condition de pluriinfection (*E. coli*, *M. luteus*, *Rhizopus*, phytoplasme de la Flavescence dorée) par Jean-Luc Danet au laboratoire appuie cette hypothèse : aucune des 15 000 séquences analysées par BlastX (Blast2GO) n'a présenté d'homologie avec des peptides antimicrobiens. L'analyse du génome du puceron *Acyrtosiphon pisum* (ordre des Hémiptères auquel appartiennent les cicadelles) a également montré que les gènes codant les peptides antimicrobiens étaient absents (Gerardo et al., 2010). Enfin chez le réduve *Rhodnius prolixus* (insecte hémiptère vecteur du parasite *Trypanosoma cruzi*) seules les défensines semblent présentes (Ursic-Bedoya and Lowenberger, 2007). Pour compléter cette approche, j'ai réalisé des alignements multiples à partir des séquences de défensines de *Rhodnius prolixus*, *Culex quinquefasciatus* et *Anopheles gambiae*. L'utilisation d'amorces dégénérées synthétisées à partir de ces alignements n'a pas permis d'amplifier de gènes codant une défensine chez *C. haematoceps*. L'ensemble de ces résultats suggère que l'ensemble des peptides antimicrobiens connus à ce jour seraient absents chez de nombreux insectes appartenant à l'ordre des Hémiptères. Toutefois, il a récemment été montré chez *A. pisum* que la pathogénicité de la bactérie *Dickeya dadantii* était corrélée à l'expression de gènes de résistance aux peptides antimicrobiens (Costechareyre et al., 2013). Ce résultat suggère alors que le puceron produirait des peptides antimicrobiens bien qu'aucune des analyses moléculaires et biochimiques n'ait permis de les identifier. Nous pouvons donc supposer que l'activité antibactérienne observée dans nos expériences pourrait être due à la production de peptides antimicrobiens propres à *C. haematoceps* et dont la séquence en acides aminés diffère de celle des peptides antimicrobiens déjà connus.

Chez les insectes, la synthèse des peptides antimicrobiens est régulée par les voies de signalisation Toll et Imd faisant intervenir de nombreux intermédiaires membranaires (PGRPs), cellulaires (Myd88) et nucléaires (Relish). L'absence des gènes codant ces intermédiaires parmi les banques soustractives, suggère que les voies de signalisation impliquées dans la synthèse des effecteurs plasmatiques de *C. haematoceps* seraient différentes de celles identifiées chez de nombreux insectes (Hoffmann and Reichhart, 2002;

Jiang et al., 2010; Yassine and Osta, 2010). L'absence de la plupart des intermédiaires des voies Toll et Imd chez *A. pisum* appuie cette hypothèse (Gerardo et al., 2010). L'identification des effecteurs impliqués dans la réponse humorale de *C. haematoceps* pourrait se faire à partir de plasma prélevé chez des insectes infectés, en utilisant les techniques d'HPLC et de spectrométrie de masse tel que cela a déjà été fait chez la blatte *Blaberus discoidalis* et la fourmi *Tetramorium bicarinatum* (Chen et al., 1999; Rifflet et al., 2012). Il pourrait également être intéressant de tester la spécificité d'action de ces effecteurs en réalisant des tests d'inhibition de croissance sur plusieurs types de bactéries à Gram positive (*Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus aureus*) et négative (*Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*). Une fois les effecteurs identifiés, une approche d'interférence par ARN permettrait de vérifier leur rôle la réponse humorale dirigée contre *M. luteus*.

## **1. 2. Activité phénoloxidase**

Le suivi de l'hydrolyse de la L-dopamine a permis de mettre en évidence une activité phénoloxidase de type tyrosinase dans le plasma et les hémocytes. Nos résultats ont également montré que l'infection par *M. luteus* entraînait une augmentation de l'activité phénoloxidase dans le plasma. Néanmoins aucun gène codant la Pro-phénoloxidase n'a été identifié dans les banques soustractives de *C. haematoceps* ni dans la banque d'ESTs d'*E. variegatus*. Malgré la présence d'une activité phénoloxidase chez plusieurs insectes hémiptères tels que *Veneza zonata*, *Nephotettix cincticeps* et *Eurygaster integriceps* (Baccan et al., 2001; Hattori et al., 2005; Zibae et al., 2011), le gène codant cette enzyme a seulement été identifié chez le puceron (*A. pisum*), le psylle (*Diaphorina citri*) et la punaise (*Anasa tristis*) (Gerardo et al., 2010; Shelby, 2013). Ces résultats nous ont donc amenés à penser que l'hydrolyse de la L-dopamine pourrait être réalisée par une autre protéine. En effet, il a été montré que la Pro-phénoloxidase présentait des similarités de séquence et de structure avec des protéines appartenant à la famille des Hémocyanines (Burmester, 2001, 2002; Burmester and Schellen, 1996; Burmester et al., 1998). Une activité phénoloxidase-like a depuis été décrite pour certaines de ces protéines, notamment chez les crustacés (Arockiaraj et al., 2013; Glazer et al., 2013; Idakieva et al., 2013). Chez *C. haematoceps* des gènes codant des Hémocyanines ont été identifiés dans les banques soustractives. Parmi ces

gènes, nous nous sommes particulièrement intéressés au gène codant l'Hexamérine. L'Hexamérine est une protéine d'environ 500 KDa formée de 6 sous-unités et qui est synthétisée par les cellules du corps gras (Burmester and Schellen, 1996). Chez les insectes holométaboles, elle représente la protéine la plus abondante de l'hémolymphe (Scheller et al., 1990). L'Hexamérine est décrite comme intervenant dans la métamorphose où elle jouerait un rôle de stockage d'acides aminés formant une source d'énergie importante lors du développement larvaire (Levenbook and Bauer, 1984). Elle est également ré-internalisée dans les cellules du corps gras par endocytose via un récepteur à Arylphorine (Wang and Haunerland, 1994). Toutefois, des travaux menés chez la blatte *Blaberus discoidalis* ont montré que l'Hexamérine pouvait aussi jouer un rôle de lectine capable de lier le  $\beta$ -1,3-glucane et d'intervenir dans l'activité phénoloxidase (Chen et al., 1999; Fallon et al., 2011; Fang et al., 2010). Nos expériences de RT-PCR quantitative indiquent que ce gène est surexprimé au temps précoce de l'infection par *E. coli* et *S. citri* bien qu'aucune activité phénoloxidase associée à cette surexpression n'ait été observée. L'Hexamérine a également été identifiée par hybridation soustractive chez le lépidoptère *Antheraea pernyi* infecté par *E. coli* et l'abeille *Apis mellifera* infectée par *Varroa destructor* (Liu et al., 2013; Zhang et al., 2010). Enfin, les similarités de séquences entre les Hexamérines et les Pro-phénoloxidases d'insectes appuient l'hypothèse d'un rôle de cette protéine dans l'activité phénoloxidase (Burmester and Schellen, 1996). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une étude fonctionnelle en utilisant une approche d'interférence par ARN. Nos résultats ont ainsi montré que l'inhibition du gène codant l'Hexamérine entraînait une diminution significative de l'activité phénoloxidase dans le plasma et le SLH. L'Hexamérine semblerait donc être impliquée dans l'activité phénoloxidase chez *C. haematocephus*. Cependant nos résultats ne permettent pas de savoir si l'Hexamérine agit directement sur le substrat ou si elle agit en amont, tel un facteur d'activation de la Pro-phénoloxidase (Cerenius et al., 2008). L'absence du domaine tyrosinase nécessaire à la l'hydrolyse de la L-dopamine n'appuie pas cette hypothèse. Il serait alors intéressant de purifier cette protéine afin de mieux comprendre son rôle dans l'activité phénoloxidase, tel que cela a été fait chez *Blaberus discoidalis* (Chen et al., 1999).

### **1. 3. Gènes impliqués dans la réponse immunitaire de *C. haematoceps***

Le gène codant la Pro-phénoloxidase n'est pas le seul à ne pas avoir été retrouvé dans les banques soustractives de *C. haematoceps*. En effet, aucun gène codant des peptides antimicrobiens ni d'intermédiaires des voies Toll et Imd n'ont été identifiés. Pour expliquer ce résultat étonnant, nous avons d'abord pensé que le nombre d'ESTs séquencés n'était pas suffisant bien que l'étude de la redondance ait indiqué le contraire. Cependant, l'absence de ces gènes parmi les 15 000 ESTs de la banque d'*E. variegatus* nous a permis d'écarter cette hypothèse. Ces résultats ne signifient pas pour autant que ces gènes ne sont pas présents chez ces 2 espèces. Il faudrait pour cela analyser le génome de *C. haematoceps* tel que cela a été fait chez *A. pisum* (Gerardo et al., 2010). À moindre coût, une approche par RNAseq permettrait également de confirmer l'absence de ces gènes. Néanmoins la présence d'une quantité importante (10%) de séquences codantes ne présentant aucune homologie avec les banques de données a attiré notre attention. Ce résultat a confirmé l'obstacle majeur que représentait le manque de données protéiques et nucléiques sur les insectes appartenant à l'ordre des Hémiptères. Il se pourrait que certaines de ces séquences codent des effecteurs plasmatiques encore inconnus tel que de récents travaux réalisés chez le puceron le suggèrent (Costechareyre et al., 2013). Toutefois, l'analyse des ESTs des banques soustractives de *C. haematoceps* a permis d'identifier des gènes récemment décrits comme pouvant intervenir dans la réponse immunitaire. Six des 23 gènes ainsi identifiés ont été retenus et leur expression a été suivie lors d'une infection bactérienne.

L'analyse des résultats de RT-PCR quantitative a montré que l'infection par *E. coli* et *M. luteus* induisait une surexpression des gènes codant l'Apolipophorine et la Thiorédoxine peroxydase. Concernant l'Apolipophorine, des travaux menés sur les lépidoptères *Galleria mellonella* et *Hyphantria cunea* ont montré que cette protéine, impliquée dans le transport de particules lipidiques, pouvait agir en tant que récepteur capable de lier le LPS et le LTA (Halwani et al., 2000; Jiang et al., 2010; Kim et al., 2004; Satyavathi et al., 2014; Schmidt et al., 2010; Weers and Ryan, 2006; Whitten et al., 2004). Il a été montré notamment chez *Tribolium castaneum* et *Galleria mellonella* qu'une infection bactérienne ou fongique entraînait une surexpression du gène codant l'Apolipophorine (Contreras et al., 2013; Fallon et al., 2011). Cette protéine semble donc être un récepteur dont le rôle dans la phagocytose bactérienne est discuté dans le paragraphe suivant **(2. La composante cellulaire)**.

La surexpression du gène codant la Thiorédoxine peroxydase est en accord avec les travaux réalisés sur *Spodoptera litura* (lépidoptère), *Sitophilus zeamais* (coléoptère), *Homarus americanus* (crustacé) et *Rhodnius prolixus* (hémiptère) chez qui ce gène a été identifié par hybridation soustractive (Chen et al., 2012; Heddi et al., 2005; K Fraser Clark, 2012; Ursic-Bedoya and Lowenberger, 2007). La Thiorédoxine peroxydase a été décrite pour avoir un rôle d'antioxydant permettant d'éliminer, entre autres, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites notamment au cours de la phagocytose de bactéries (Baeuerle et al., 1996; Chen et al., 2014; Nappi and Ottaviani, 2000; Radyuk et al., 2003). Le rôle de cette protéine lors de la phagocytose de bactéries *E. coli* par les hémocytes est discuté dans le paragraphe suivant **(2. La composante cellulaire)**.

Les résultats de RT-PCR quantitative ont également montré que l'infection par *M. luteus* entraînait la surexpression du gène codant la DNA damage-binding protein 1 (DDBP1). Il a été montré chez la drosophile que cette protéine, intervenant dans la réparation de l'ADN, était aussi impliquée dans la maturation des plasmatocytes ainsi que dans l'activité phénoloxidase et la synthèse de peptides antimicrobiens tels que l'Attacine et la Drosomycine (Takata et al., 2004). La caractérisation de la composante humorale du système immunitaire de *C. haematocephus* a montré que l'infection par *M. luteus* entraînait une réponse de type phénoloxidase et la production de composés antibactériens. Ce résultat pourrait donc expliquer l'induction du gène codant la DDBP1 lors de l'infection par *M. luteus*. Pour confirmer cette hypothèse, une approche d'interférence par ARN a été initiée. Cependant, la synthèse de l'ARNdb n'ayant pas fonctionné pour ce gène, les expériences ont été suspendues. La compréhension du mode d'action de la DDBP1 reste cependant importante car aucuns travaux hormis ceux de la drosophile n'ont été publiés concernant le rôle de cette protéine dans le système immunitaire des insectes.

## **2. La composante cellulaire**

Après avoir identifié une partie de la composante humorale, je me suis intéressé à la réponse cellulaire en caractérisant d'abord les différents types hémocytaires de *C. haematoceps*, puis en étudiant la réponse cellulaire lors d'une infection bactérienne. Les observations en microscopie optique et à épifluorescence ont permis d'identifier 4 types d'hémocytes circulants (pro-hémocytes, sphérulocytes, granulocytes et plasmatocytes). Des résultats similaires ont été obtenus chez la drosophile, l'anophèle et le puceron (Borges et al., 2008; Lavine and Strand, 2002; Schmitz et al., 2012). En l'absence de moyens techniques adaptés, seuls les hémocytes adhérents (granulocytes et plasmatocytes) ont été étudiés.

Les observations en microscopie à épifluorescence ont montré que ces hémocytes étaient capables de phagocyter des billes de latex et des bactéries de type *E. coli*. Des nodules d'hémocytes ayant phagocytés *E. coli* ont également été observés. Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés chez les hémiptères *Acyrtosiphon pisum* et *Triatoma infestans* (Borges et al., 2008; Schmitz et al., 2012) et suggèrent que la composante cellulaire de *C. haematoceps* est fonctionnelle.

La caractérisation du système immunitaire de la cicadelle a montré que la composante humorale n'avait pas d'effet sur la bactérie *E. coli*. Une phagocytose par les hémocytes a cependant été observée. L'élimination d'*E. coli* après injection de  $10^3$  et  $10^1$  bactéries dans l'insecte suggèrent que cette phagocytose est efficace. Une approche par microscopie électronique à transmission (MET) pourrait être réalisée afin d'identifier des structures cellulaires spécifiques (phagolysosome et bactéries dégradées) tel que cela a été fait chez le moustique *Armigeres subalbatus* (Hillyer et al., 2003b). La phagocytose d'*E. coli* par les hémocytes pourrait également expliquer la surexpression du gène codant la Thiorédoxine peroxydase, intervenant notamment dans l'élimination des ROS produits par les hémocytes lors de la phagocytose. La détection de ROS telle que cela a été fait chez le puceron *Acyrtosiphum pisum*, au niveau des hémocytes ayant phagocytés *E. coli* permettrait de vérifier cette hypothèse (Schmitz et al., 2012). Une approche d'interférence par ARN permettrait de vérifier si l'inhibition du gène codant la peroxydase entraîne une accumulation de ROS dans les hémocytes phagocytants.



La phagocytose et la nodulation sont deux processus cellulaires qui nécessitent la reconnaissance des micro-organismes par les hémocytes via différents récepteurs (PGRPs, lectines) (Dziarski, 2004; Ferrandon et al., 2004; Satyavathi et al., 2014). Aucun gène codant ces récepteurs n'a cependant été identifié dans les banques soustractives de *C. haematoceps*. Ce résultat ne signifie pas pour autant que ces gènes sont absents chez la cicadelle. En effet, un grand nombre de ces récepteurs (13 PGRPS/L, 3 lectines de type C) ont été identifiés dans la banque d'EST d'*E. variegatus*. L'absence de ces gènes dans les banques soustractives de *C. haematoceps* reste cependant en contradiction avec les travaux réalisés sur le charançon *Sitophilus zeamais*, le coléoptère *Tribolium castaneum*, le lépidoptère *Pieris rapae* et le mollusque *Biomphalaria glabrata* chez qui les PGRPs et les lectines de type C ont été identifiés par hybridation soustractive (Altincicek et al., 2008b; Anselme et al., 2006; Fang et al., 2010; Guillou et al., 2007).

L'analyse des banques soustractives de *C. haematoceps* ainsi que les expériences de RT-PCR quantitative ont montré que le gène codant l'Apolipophorine était surexprimé lors d'une infection par *E. coli* et *M. luteus*. Comme nous l'avons dit précédemment **(1. 3. Gènes impliqués dans la réponse immunitaire de *C. haematoceps*)**, l'Apolipophorine agit comme un récepteur liant le LPS et le LTA. Les travaux menés sur les lépidoptères *Galleria mellonella* et *Hyphantria cunea* ont également montré que cette protéine favorisait la phagocytose des bactéries par les hémocytes (Halwani et al., 2000; Jiang et al., 2010; Kim et al., 2004; Satyavathi et al., 2014; Schmidt et al., 2010; Weers and Ryan, 2006; Whitten et al., 2004). La surexpression du gène codant l'Apolipophorine lors de l'infection par *E. coli* laisse alors penser que cette protéine pourrait intervenir dans la phagocytose de cette bactérie par les hémocytes de *C. haematoceps*. À court terme il est envisageable d'utiliser une approche d'interférence par ARN tel que cela a été fait chez l'anophèle, afin de voir si l'inhibition du gène codant l'Apolipophorine entraîne une diminution de la phagocytose d'*E. coli* (Contreras et al., 2013; Gupta et al., 2010b). Si c'est le cas, une même approche pourrait également être utilisée pour étudier le rôle de l'Apolipophorine dans la survie de *C. haematoceps* suite à l'infection par *E. coli* mais aussi *M. luteus* comme cela a été fait chez le lépidoptère *Plutella xylostella* (Son and Kim, 2011).



Une activité phénoloxidase a été observée au niveau des hémocytes adhérents. Bien que certaines images soient nettes, le protocole utilisé n'a pas permis d'affirmer avec certitude que l'activité phénoloxidase observée était présente au niveau intracellulaire. En effet, chez *Manduca sexta* il a été montré que la Pro-phénoloxidase était capable de se lier à la surface des granulocytes et des plasmatocytes (Ling and Yu, 2005). Toujours chez *Manduca sexta* il a été montré qu'un seul type d'hémocyte appelé oenocytoïde produisait la Pro-phénoloxidase (Jiang et al., 1997). Aucun oenocytoïde n'a cependant été observé chez *C. haematocephs*. Ce résultat suggère que les plasmatocytes et les granulocytes pourraient produire eux-mêmes cette enzyme. Cependant l'absence de gène codant la Pro-phénoloxidase dans les banques soustractives de *C. haematocephs* et la banque d'ESTs d'*E. variegatus* écarte cette hypothèse. Néanmoins les résultats de l'injection de l'ARNdb Hex ont montré que l'Hexamérine était impliquée dans l'activité phénoloxidase dans les hémocytes. Ces résultats sont en accord avec les travaux menés sur *Blaberus discoidalis* chez qui une hexamérine est impliquée dans l'activité phénoloxidase au niveau des hémocytes (Chen et al., 1999). L'observation de l'activité phénoloxidase au niveau des hémocytes adhérents lors d'une expérience d'interférence par ARN pourrait nous apporter des éléments de réponse. Toutefois, aucun des travaux menés sur l'Hexamérine n'indiquent que cette protéine puisse être produite par les hémocytes.

## II. La réponse à l'infection par *S. citri*

L'importante réduction de la charge bactérienne observée au temps précoces de l'infection par *S. citri* suggérait que la réponse immunitaire de *C. haematoceps* était efficace contre cette bactérie. Cependant les tests d'inhibition de croissance ont montré que contrairement à *E. coli* et *M. luteus*, l'infection par *S. citri* n'induisait pas la production d'effecteurs plasmatiques ayant une activité antibactérienne sur *M. luteus*. De plus, aucune activité antibactérienne de ces effecteurs n'a été observée sur *S. citri*. Ces résultats laissaient penser d'une part que la composante humorale du système immunitaire de *C. haematoceps* ne jouait pas un rôle majeur dans l'élimination de *S. citri* et d'autre part, que cette bactérie n'était pas reconnue de la même manière que les bactéries *E. coli* et *M. luteus*. Cette hypothèse était soutenue par l'absence de paroi et de membrane externe chez les spiroplasmes (Whitcomb and Williamson, 1975) ainsi que les travaux menés sur les spiroplasmes NSRO et *S. poulsonii* présents chez la drosophile (Anbutsu and Fukatsu, 2010; Herren and Lemaitre, 2011; Hurst et al., 2003; Hutchence et al., 2011; Jaenike et al., 2010).

L'absence de paroi et de membrane externe laissait imaginer que *S. citri* ne serait pas reconnues par les hémocytes et ne pourrait donc pas être phagocytée. La réponse cellulaire à l'infection par *S. citri* a donc été étudiée et nos observations ont montré la présence de spiroplasmes au niveau du corps cellulaire des granulocytes et des plasmotocytes. Ce résultat est en accord avec les travaux menés sur le crabe *Eriocheir sinensis* chez qui le spiroplasme *S. eriocheiris* a été observé dans les hémocytes (Wang et al., 2004b). Néanmoins dans ce modèle la présence de spiroplasmes dans les hémocytes semble être un processus invasif provoquant une mortalité cellulaire importante (Liang et al., 2012; Wang et al., 2004b).

Afin de savoir si la réponse cellulaire de *C. haematoceps* permet d'éliminer *S. citri* efficacement, il serait intéressant de détecter la présence de ROS dans des hémocytes ayant phagocytés des spiroplasmes. Néanmoins, il a été montré chez la drosophile (mutant *Hemoless* dépourvu d'hémocytes circulants) que la phagocytose de *S. poulsonii* n'avait pas d'impact sur la multiplication des spiroplasmes dans l'hémolymph (Herren and Lemaitre, 2011).

La phagocytose de *S. citri* par les hémocytes de *C. haematoceps* pourrait en partie s'expliquer par la reconnaissance de la lipoprotéine majeure de surface appelée Spiraline (Whitcomb et al., 1983; Wróblewski et al., 1977). En effet il a été montré chez la souris que la Spiraline induisait une réponse immunitaire caractérisée par une multiplication des lymphocytes B ainsi qu'une production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6). Cette reconnaissance pourrait se faire par l'Apolipophorine, connue pour lier plusieurs types de lipoprotéines, favorisant ainsi la phagocytose des spiroplasmes (Chetty et al., 2003a, 2003b; Weers et al., 2000; Whitten et al., 2004). Néanmoins les expériences de RT-PCR quantitative ont montré que l'infection par *S. citri* entraînait une sous-expression du gène codant l'Apolipophorine, contrairement à *E. coli* et *M. luteus*. Cette inhibition pourrait alors représenter un mécanisme d'échappement immunitaire mis en place par *S. citri*. Nos résultats qui montrent que le nombre de spiroplasmes présents au niveau des hémocytes adhérents diminue au cours du temps appuient cette hypothèse.

Afin de savoir si l'Apolipophorine intervient réellement dans la reconnaissance et la phagocytose de *S. citri* par les hémocytes, une approche par ARN interférant pourrait être réalisée. Si l'inhibition du gène entraîne une diminution du nombre de spiroplasmes phagocytés, il serait intéressant de suivre la charge bactérienne ainsi que le taux de survie de la cicadelle infectée par *S. citri*. Il serait également intéressant de purifier l'Apolipophorine et d'observer une éventuelle agglutination des spiroplasmes cultivés en milieu liquide. Si un effet est observé sur les spiroplasmes *in vitro*, il pourrait alors être envisagé d'injecter la protéine purifiée dans des insectes infectés par *S. citri* et de suivre l'évolution de la charge bactérienne ainsi que la phagocytose par les hémocytes.

L'analyse des résultats de RT-PCR quantitative a montré que l'infection par *S. citri* entraînait une surexpression du gène codant l'Hexamérine. Comme indiqué précédemment, cette protéine intervient dans l'activité phénoloxidase au niveau du plasma et des hémocytes. Nous avons donc suivi l'activité phénoloxidase dans ces 2 compartiments au cours de l'infection par *S. citri*. Les résultats ont montré que contrairement à *M. luteus*, l'infection par *S. citri* entraînait une inhibition de l'activité phénoloxidase. Ce résultat est en contradiction avec la surexpression du gène codant l'Hexamérine et suggère que *S. citri* pourrait interagir de façon directe ou indirecte avec cette protéine causant une réduction de l'activité phénoloxidase.

Cette perturbation pourrait se faire par l'intermédiaire d'inhibiteurs de sérine protéases, tel que la Pacifastine, connus pour réguler négativement l'activité phénoloxidase (Breugelmans et al., 2009; Franssens et al., 2008; Kanost, 1999; Liu et al., 2007; Simonet et al., 2003). Cependant, les travaux menés chez le crabe *Eriocheir sinensis* n'appuient pas cette hypothèse. En effet, il a été décrit que l'infection par le spiroplasma *S. eriocheiris* induisait une inhibition du gène codant la Pacifastine (Meng et al., 2014). L'inhibition de l'activité phénoloxidase pourrait plutôt faire intervenir un ou plusieurs métabolites secondaires produits par *S. citri* comme c'est le cas avec *Xenorhabdus nematophila* dont la production de benzylideneacetone (BZA) entraîne une inhibition de l'activité phénoloxidase chez le lépidoptère *Plutella xylostella* (Song et al., 2011). Il serait alors intéressant de rechercher la présence de ces métabolites par HPLC dans le surnageant de culture de *S. citri* ainsi que dans l'hémolymph d'insectes infectés.

Par ailleurs, l'étude fonctionnelle par une approche d'interférence par ARN a montré que l'Hexamérine était impliquée dans la survie de *C. haematoceps* face à *S. citri* mais n'intervenait pas dans le contrôle de la charge bactérienne. La surexpression du gène codant l'Hexamérine au début de l'infection constituerait donc un mécanisme de défense permettant à *C. haematoceps* de survivre face à la multiplication de *S. citri*.

Afin de mieux comprendre le rôle de l'Hexamérine dans la survie de *C. haematoceps* face à l'infection par *S. citri*, il serait intéressant de purifier cette protéine et d'observer son effet sur des spiroplasmes en culture (lyse, agglutination). Il serait également intéressant d'injecter la protéine purifiée dans l'insecte afin de voir si la présence de l'Hexamérine en quantité importante dans l'hémolymph pourrait faciliter l'élimination de *S. citri*.

Enfin, nos expériences de RT-PCR quantitative ont également montré que le gène codant la Thiorédoxine peroxydase était surexprimé au temps précoce de l'infection par *S. citri*. Ce résultat suggère donc que l'infection par *S. citri* induit un stress chez l'insecte. Ces résultats sont en accord avec ceux de la crevette *Macrobrachium rosenbergii* chez qui l'infection par *Spiroplasma* sp. MR-1008 entraîne une surexpression des gènes codant des enzymes détoxifiantes telles que la superoxyde dismutase (SOD). Par ailleurs, la présence de *S. citri* au niveau des hémocytes pourrait expliquer la surexpression du gène codant la Thiorédoxine peroxydase. Toutefois, aucune détection de ROS n'a été réalisée sur des hémocytes ayant phagocytés *S. citri*.

Récemment il a été montré que la Thiorédoxine peroxydase intervenait dans la résistance de *Spodoptera litura* face à l'infection par le pathogène fongique *Nomuraea rileyi* (Chen et al., 2014). Chez *C. haematoceps* l'expression de ce gène témoignerait, comme pour l'Hexamérine, d'une réaction de défense de la cicadelle face à l'infection par *S. citri*.

Pour mieux comprendre le rôle de la Thiorédoxine peroxydase, il serait intéressant dans un premier temps de mettre en évidence la production de ROS au niveau des hémocytes ayant phagocytés des spiroplasmes. Une approche d'interférence par ARN permettrait ensuite de voir si l'inhibition du gène codant la Thiorédoxine peroxydase entraîne une accumulation de ROS dans les hémocytes. Cette approche permettrait également d'étudier le rôle de cette protéine dans la survie de *C. haematoceps* face à l'infection par *S. citri*.

### III. Conclusion générale

Chez *C. haematoceps* l'infection par *S. citri* entraîne la mise en place d'une réponse immunitaire faisant intervenir les composantes humorale (activité phénoloxidase) et cellulaires (phagocytose et nodulation). Les résultats des hybridations soustractives et de RT-PCR quantitative ont permis d'identifier 3 gènes impliqués dans la réponse à l'infection. Ces gènes codent l'Hexamérine, la Thiorédoxine peroxydase et la DNA damage-binding protein 1. Une approche d'interférence par ARN a montré que le gène codant l'Hexamérine intervenait dans l'activité phénoloxidase au niveau du plasma et des hémocytes. Néanmoins le maintien des spiroplasmes dans l'insecte suggère que *S. citri* parvient à résister sinon contourner cette réponse immunitaire. En effet, nos observations ont montré qu'au cours de l'infection, *S. citri* inhibe l'activité phénoloxidase dans le plasma et échappe à la phagocytose. Le suivi de la charge bactérienne montre que cette adaptation est rapide (entre 3 et 6 jours) et permet au spiroplasma de se multiplier de façon importante sans pour autant affecter la longévité de *C. haematoceps*. L'approche d'interférence par ARN a permis d'identifier le gène codant l'Hexamérine comme étant impliqué dans la survie de la cicadelle face à l'infection. À ce titre, l'Hexamérine semble être à la fois un gène d'immunité et un gène de tolérance.

# **Matériels et méthode**

## 1. Ecologie et Microbiologie

### 1. 1. Elevage d'insecte

La cicadelle *Circulifer haematoceps*, capturée en Corse (Vignault J. C., 1980b) a été élevée sur giroflées (*Matthiola incana*) dans des cages grillagées au sein d'un insectarium maintenu à 25°C. Toutes les expériences d'infection ont été réalisées sur insectes sains adultes, par micro-injection abdominale à l'aide d'aiguilles effilées (Foissac et al., 1996). Les insectes ont ensuite été replacés sur des giroflées pour la suite de l'expérience (extraction d'ARN, prélèvement d'hémolymphe, suivi de la croissance bactérienne...).

### 1. 2. Infection bactérienne

Quatre souches bactériennes ont été utilisées. La souche GII3 de *Spiroplasma citri* originaire du Maroc (Vignault J. C., 1980b) a été cultivée dans du milieu SP4 à 32°C. La souche TOP 10 (Invitrogen) d'*Escherichia coli* ainsi que la bactérie *Micrococcus luteus* ont été cultivées dans du milieu LB (Fisher Scientific) sous agitation à 37°C (Nimmo et al., 1997). La souche DH5- $\alpha$ -DsRed d'*Escherichia coli*, seulement utilisée pour suivre la phagocytose, a été cultivée dans du milieu LB contenant de l'ampicilline (100  $\mu$ g/ml). Les infections ont été réalisées à partir d'une culture dont le titre atteint  $10^8$  bactéries/ml. Pour *S. citri*, cette concentration est atteinte dans une culture âgée de 2 jours. Pour *E. coli* (Top 10 et DH5- $\alpha$ -DsRed) et *M. luteus*, cette concentration correspond à une  $DO_{550}$  de 0,5. Avant injection, les bactéries ont été centrifugées (10000 g, 20 min pour *S. citri* et 2500 g, 10 min pour *E. coli* et *M. luteus*) puis reprises dans du milieu de culture frais et diluées si besoin au  $1/100^{\text{ème}}$  ou au  $1/10\,000^{\text{ème}}$ .

### 1. 3. Suivi de la charge bactérienne dans l'insecte

Pour chaque type de bactéries (*E. coli*, *M. luteus* ou *S. citri*), un suivi de la croissance bactérienne dans l'insecte a été réalisé. Pour cela, différentes quantités de bactéries ont été injectées ( $10^5$ ,  $10^3$  et  $10^1$ ) et leur multiplication dans l'insecte a été mesurée 1, 3, 6 et 13

jours après injection. Pour *E. coli* et *M. luteus*, le nombre de bactéries par insecte a été estimé en utilisant la méthode des CFU (Colonie Formant Unité). Trois insectes sont broyés dans 1 ml de milieu LB et le broyat est dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  plusieurs fois consécutives, jusqu'à obtenir un facteur de dilution de  $10^8$ . Chaque dilution est ensuite étalée (100  $\mu$ l) sur boîte gélosée (LB +Agar) avant d'être placée en incubation (12 h, 37°C). Le nombre de colonies dénombrées, associé au facteur de dilution et au nombre d'insectes broyés, permet ainsi d'estimer la quantité de bactéries par insecte. Pour *S. citri*, le nombre de bactéries par insecte a été estimé en utilisant la méthode des CCU (Color Changing Units). Trois insectes sont broyés dans 1 ml de milieu SP4 et le broyat est ensuite filtré (0,45  $\mu$ m, Sigma-Aldrich®) avant d'être dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  plusieurs fois consécutives, jusqu'à obtenir un facteur de dilution de  $10^8$ . Chaque dilution est directement placée en incubation (7 j, 32°C) et la dernière dilution pour laquelle le milieu SP4 s'acidifie (jauni) permet d'estimer la quantité de spiroplasmes par insecte. Pour chaque dilution, la présence de spiroplasmes a également été vérifiée au microscope optique à fond noir.

#### 1. 4. Suivi de la mortalité

Le suivi de la mortalité des insectes a été réalisé après injection de *S. citri* (culture diluée au  $1/100^{\text{ème}}$ ) ou de milieu SP4, chez des insectes ayant déjà subi une injection d'ARNdb Hex et GFP, 6 jours auparavant. Le nombre d'insectes morts a ensuite été évalué 1, 2, 3, 6 et 13 jours après injection (*S. citri*, milieu SP4). Les courbes de survies ont été réalisées à partir de 5 répliquats biologiques en utilisant la représentation de Kaplan-Meier. Les données ont ensuite été analysées avec un test statistique du log-rank. En parallèle, un suivi du nombre de spiroplasmes par insecte a été réalisé pour chaque échantillon en utilisant la méthode des CCU (Color Changing Units).



## 2. Biologie moléculaire

### 2. 1. Extraction de l'ARN total au TRIzol® et traitement à la DNase

Dix insectes sont broyés dans 1 ml de TRIzol® froid (Invitrogen). Après incubation (5 min, température ambiante), le broyat est centrifugé (10 000 g, 10 min, 4°C) et le surnageant est repris dans 200 µl de chloroforme pur. Après incubation (3 min, température ambiante), l'extrait est centrifugé (10 000 g, 15 min, 4°C) et la phase aqueuse est transférée dans un nouveau microtube puis mélangée avec 500 µl d'isopropanol. Après incubation (10 min, température ambiante), l'échantillon est centrifugé à nouveau (10 000 g, 10 min, 4°C) et le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol (75%) puis centrifugé une dernière fois (10 000 g, 5 min, 4°C). Le culot séché contenant l'ARN total est dissout dans 80 µl d'eau DEPC (DiEthylPyroCarbonate) avant de procéder à un traitement à la DNase afin d'éliminer les traces d'ADN. Pour cela, les échantillons (80 µl) sont mélangés avec 10 µl (10 unités) de DNase RQ1 (Promega) et 10 µl de 10X Reaction Buffer pour obtenir un volume final de 100 µl. Après incubation (2 h, 37°C), le traitement est stoppé par l'ajout de 100 µl de phénol saturé en Tris (Eurobio). Après centrifugation (10 000 g, 5 min, 4°C), l'ARN total de la phase supérieure (100 µl) est purifiée en ajoutant 100 µl d'une solution de chloroforme/alcool iso-amylque (24/1). Après centrifugation (10 000 g, 5 min), la phase supérieure est transférée dans un dernier microtube puis mélangée avec 10 µl d'acétate de sodium (3M, pH 5,2) et 250 µl d'éthanol absolu et froid. Les échantillons sont mis à précipiter (2 h, -80°C) puis centrifugés (10 000 g, 15 min). Le culot est lavé avec 500 µl d'éthanol (70%), centrifugé (10 000 g, 5 min, 4°C), séché et repris dans 20 µl d'eau DEPC. L'ARN total ainsi purifié a été conservé à -80°C avant d'être utilisé pour les expériences de RT-PCR quantitative.

### 2. 2. Electrophorèse sur gel d'agarose et dosage de l'ARN total

La taille moyenne des ARN extraits a été estimée par électrophorèse sur gel d'agarose (1%) en condition dénaturante (MOPS 80 mM, EDTA, 1,5 mM pH8, formaldéhyde 0,2%, BET 3 µg/ml). La migration (2 h, 80V) a été faite dans un tampon MOPS/EDTA (80 mM/1,5 mM). En parallèle, l'ARN total de chaque échantillon a été dosée avec le NanoDrop® Epoch-Microplate Spectrophotometer (Biotech® Instrument, Inc, Winooski, Vermont USA).

## 2. 3. RT-PCR quantitative en temps réel

La technique de RT-PCR quantitative en temps réel permet de quantifier les transcrits d'un gène donné, de manière relative ou absolue. Pour nos expériences, nous avons choisi la quantification relative. Cette méthode repose sur la comparaison des Cts ( $\Delta$ Ct) entre le gène d'intérêt et le gène de référence (tubuline- $\beta$ ). Le gène de référence est choisi pour avoir un Ct stable, quelles que soient les conditions expérimentales. Chaque variation du  $\Delta$ Ct traduit donc un changement d'expression du gène d'intérêt. Le  $\Delta$ Ct de chaque échantillon est ensuite comparé au  $\Delta$ Ct d'un échantillon contrôle, pour obtenir un  $\Delta\Delta$ Ct. La comparaison des  $\Delta\Delta$ Cts des 2 échantillons permet ensuite de déterminer si le gène d'intérêt est surexprimé ou sous-exprimé d'une condition à l'autre.

### 2. 3. 1. *Synthèse des ADNc par transcriptase reverse*

Selon les expériences, l'ARN total a été extrait au TRIzol® 30 minutes, 4 heures et 6 jours après injection (milieu de culture, bactéries, ARNdb) puis a servi de matrice pour une étape de transcriptase reverse (SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Invitrogen). Cette étape permet de synthétiser les ADNc de l'ensemble des transcrits contenus dans l'échantillon (**tab. 4**). Les ADNc synthétisés ont été dilués au 1/50<sup>ème</sup> dans de l'eau DEPC avant de procéder à l'étape de PCR quantitative.

**Tableau 4 : Synthèse des ADNc pour la RT-PCR quantitative**

ARN d'insecte (2 µg/µl)	1 µl	
oligo(dT) (50 µM)	1 µl	
dNTP (10 mM de chaque)	1 µl	
Eau DEPC	10 µl	
Incubation	5 min 5 min	65°C 4°C
5X First-Strand Buffer	4 µl	
DTT (0,1 M)	1 µl	
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (40 unités/µl)	1 µl	
SuperScript™ III RT (200 unités/µl)	1 µl	
Incubation	5 min 60 min 15 min	25°C 50°C 70°C

### 2. 3. 2. PCR quantitative en temps réel

Pour nos expériences, l'appareil LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics) a été utilisé. Chaque PCR est réalisée en triplicat dans des capillaires, à partir de 5 µl d'ADNc (dilué au 1/50<sup>ème</sup>) pour un volume final de 25 µl (**tab. 5**). Pour chaque gène, les amorces ont été choisies de manière à amplifier un fragment d'environ 300 pb (**tab. 6**). À la fin de la PCR, les données ont été analysées à l'aide du logiciel LightCycler afin de définir le nombre de cycles à partir duquel les produits PCR sont détectés (Ct).

**Tableau 5: PCR quantitative en temps réel**

ADNc (dilué au 1/50 <sup>ème</sup> )	5 µl	
Eau DEPC	6,75 µl	
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	12,5 µl	
Primer 1 (0,15 µM)	0,375 µl	
Primer 2 (0,15 µM)	0,375 µl	
Incubation	15 min, 95°C	
PCR (40 cycles)	30s	95°C
	30s	60°C
	30s	72°C
Courbe de fusion	10 min	72°C
	20 min	72°C-95°C
	10 min	72°C

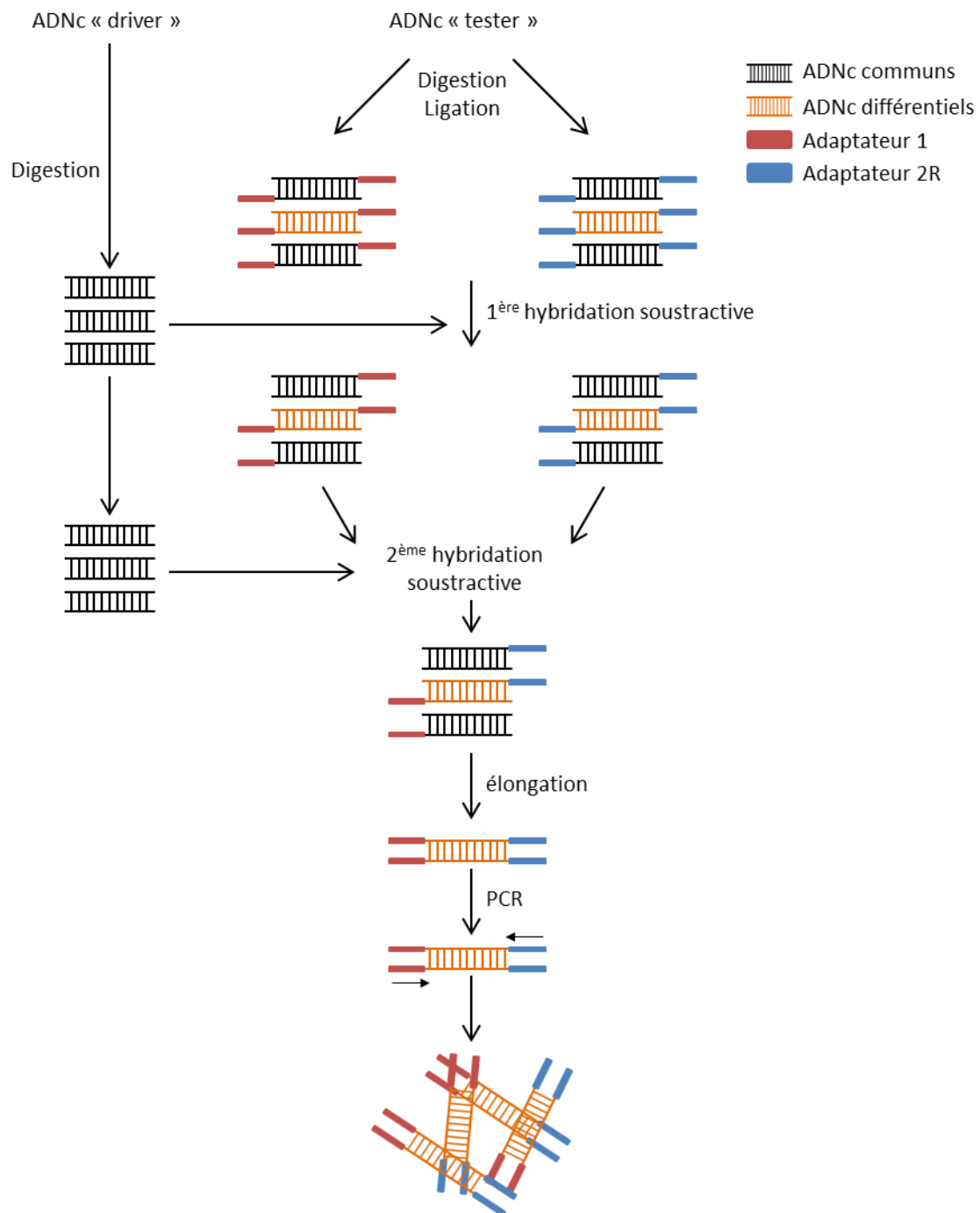
**Tableau 6 : Couples d'amorces utilisées pour la quantification des transcrits des gènes candidats par RT-PCR quantitative**

Clones	Nom de la protéine	Amorces 5' → 3'	
SSH_T7P_35	Apolipophorine	Apph_F1	TCCTTTGACTCCTCCTTTGG
		Apph_R1	TCAGCGCCAGCAACTTTATC
246_T7P_54	Trypsine-1	Tryp_F1	GGCATAAAGTCCATACAGGG
		Tryp_R1	GTTGGACTTATTGGTTGGGG
274_T7P_82	Hexamérine	Hex_F1 <sup>a</sup>	GAATGTGGAAGTCAAGTCCG
		Hex_F2 <sup>b</sup>	CTTCAAGAACCAACTGCAGC
		Hex_R1 <sup>a, b</sup>	GGTCGATCTCAACGAAGTTC
SSH_T7P_87	DNA damage-binding protein 1	DDBP1_F1	AGGAGATGGCAAGAGACTAC
		DDBP1_R1	CTGAACACGTTACCATGTC
303_T7P_15	Inhibitor of apoptosis 2	IoA_F1	TACCTGAAGATACGCCACAG
		IoA_R1	ACCACCTTTCATGATCGTGC
148_T7P_37	Thiorédoxine peroxydase	Thx_F1 <sup>a</sup>	AGTCAACTCGAAGAACTCAGC
		Thx_F2 <sup>b</sup>	TGAAGTATTCCTTGGCTCCG
		Thx_R1 <sup>a</sup>	AAGCATGGAGAAGTTTGCCC
		Thx_R2 <sup>b</sup>	CCGTGGACTCTTCATCATTG
-	pW8 GFP	Gfp_F1	GCAAGGAGGACGGCAACATCC
		Gfp_R1	GATTTTATGTTTCAGGTTTCAG
148_T7P_37	β-Tubulin	Tubβ_F1	AGTCAACTCGAAGAACTCAGC
		Tubβ_R1	CTTGTGTCCCTCACAATGTC

<sup>a</sup> Amorces utilisées pour le suivi de l'expression en condition d'infection. <sup>b</sup> Amorces utilisées pour le suivi de l'expression après l'injection des ADNdb.

## 2. 4. Hybridation soustractive d'ADNc

La technique d'hybridation soustractive permet de mettre en évidence un ensemble de gènes exprimés différemment entre 2 populations (driver et tester). Ici, elle a été utilisée pour identifier des gènes de la réponse immunitaire de la cicadelle *C. haematoceps*. La population « driver » correspond aux insectes contrôles ayant subi une injection de milieu LB ou SP4. La population « tester » correspond aux insectes infectés ayant subi une injection de bactéries *E. coli*, *M. luteus* ou *S. citri*. Pour chaque population, l'ARN total est extrait et les ADNc sont synthétisés. Les ADNc des populations « driver » et « tester » sont ensuite mélangés en condition dénaturante de sorte que les ADNc communs s'associent par hybridation pour mettre en évidence les ADNc différentiels. Pour augmenter l'efficacité de l'hybridation, les ADNc issus de la population « driver » sont en quantité saturante par rapport aux ADNc de l'échantillon « tester ». Une étape de PCR permet ensuite d'amplifier spécifiquement les ADNc différentiels. Les différentes étapes sont résumées sur la **figure 35**.



**Figure 35 :** Schéma simplifié des différentes étapes de l'hybridation soustractive

### 2. 4. 1 Synthèse des ADNc

Pour chaque condition d'infection, l'ARN total a été extrait 3, 6 et 9 h après injection. Les 3 extraits d'ARN ont ensuite été regroupés et les ADNc correspondant ont été synthétisés par transcriptase réverse en utilisant le kit PCR-Select™ cDNA Substraction Kit (Clontech). La synthèse des ADNc « driver » et « tester » est réalisée par transcriptase réverse (**tab. 7**). Les ADNc produits (100 µl) sont ensuite purifiés en ajoutant 1 volume (100 µl) d'une solution de phénol/chloroforme/alcool iso-amylque (25/24/1). Après centrifugation (10 000 g, 10 min) la phase supérieure (100 µl) est transférée dans un nouveau microtube puis mélangée avec 1 volume (100 µl) d'une solution de chloroforme/alcool iso-amylque (24/1). Après centrifugation (10 000 g, 10 min), les ADNc contenus dans la phase supérieure (100 µl) sont précipités en ajoutant 40 µl d'acétate d'ammonium (4 M) et 300 µl d'éthanol absolu. Après centrifugation (10 000 g, 20 min, 4°C), le culot est lavé avec 500 µl d'éthanol (80%) puis centrifugé (10 000 g, 10 min) et séché avant d'être repris dans 50 µl d'eau DEPC.

**Tableau 7 : Synthèse des ADNc pour l'hybridation soustractive**

Synthèse du 1 <sup>er</sup> brin des ADNc		Synthèse du second brin	
ARN d'insecte (1 µg/µl)	2 µl	ADNc (1 <sup>er</sup> brin)	10 µl
cDNA Synthesis Primer 10 µM	1 µl	Eau DEPC	48,4 µl
5X First-Strand Buffer	2 µl	5X Second-Strand	16 µl
dNTP Mix (10 µM de chaque)	1 µl	dNTP Mix (10 µM de chaque)	1,6 µl
AMV Reverse Transcriptase (20 unités/µl)	1 µl	20X Second-Strand Enzyme Cocktail	4 µl
Eau DEPC	3 µl	Incubation	120 min, 16°C
Incubation	90 min, 42°C	T4 DNA Polymerase (3 unités/µl)	2 µl
		Incubation	30 min, 16°C
		20X EDTA/Glycogen Mix	4 µl

### 2. 4. 2. Digestion enzymatique et ligation des adaptateurs

Avant l'étape d'hybridation soustractive, les ADNc « driver » et « tester » doivent subir une digestion enzymatique par Rsa I (**tab. 8**). Les ADNc digérés sont purifiés et précipités selon la procédure utilisée après la réaction de transcriptase réverse, en adaptant les volumes (50 µl). Le culot séché est ensuite repris dans 5,5 µl d'eau DEPC.

**Tableau 8 : Digestion des ADNc par RsaI**

ADNc « driver » ou « tester »	43,5 µl
10X RsaI Restriction Buffer	5 µl
Rsa I (10 unités/µl)	1,5 µl
Incubation	90 min, 37°C
20X EDTA/Glycogen Mix	2,5 µl

#### 2. 4. 3. Ligation des adaptateurs

Seuls les ADNc de la population « tester » suivent l'étape de ligation des adaptateurs (**tab. 9**). Après cette étape, on obtient 2 tubes. Dans le premier, les ADNc sont ligués avec l'adaptateur 1 et dans le second, les ADNc sont ligués avec l'adaptateur 2R (**fig. 17**).

**Tableau 9 : Ligation des ADNc « tester » avec les adaptateurs**

	Tube 1	Tube 2
ADNc « tester »	2 µl	2 µl
Adaptateur 1 (10 µM)	2 µl	-
Adaptateur 2R (10 µM)	-	2 µl
Master Mix 3 µl eau DEPC 2 µl 5X Ligation Buffer 1 µl T4 DNA Ligase (400 unités/µl)	6 µl	6µl
Incubation	12h, 16°C	
20X EDTA/Glycogen Mix	1 µl	1 µl
Incubation	5 min, 75°C	

#### 2. 4. 4. Hybridation soustractive et amplification des ADNc soustraits

L'hybridation soustractive comporte 2 étapes (**fig. 17 et tab. 10**). Les ADNc soustraits sont ensuite amplifiés par PCR (**tab. 11**) en utilisant des primers spécifiques des adaptateurs 1 et 2R. Le produit de PCR est ensuite dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  dans de l'eau DEPC avant de servir de matrice pour une PCR nichée dont le but est d'éliminer le bruit de fond et d'enrichir l'échantillon en ADNc soustraits. L'efficacité de la soustraction est ensuite vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Le profil de migration des ADNc soustraits est comparé à celui des ADNc contrôles (non-soustraits). Si le signal est plus faible chez les ADNc soustraits, l'hybridation soustractive est validée et les ADNc peuvent être clonés et séquencés.

**Tableau 10 : Hybridation soustractive des ADNc**

1 <sup>ère</sup> hybridation soustractive	A	B
ADNc « tester » (tube 1)	1,5 µl	-
ADNc « tester » (tube 2)	-	1,5 µl
d'ADNc « driver » (digéré)	1,5 µl	1,5 µl
4X Hybridization Buffer	1 µl	1 µl
Incubation	8 h, 68°C	

2 <sup>ème</sup> hybridation soustractive	
Produits 1 <sup>ère</sup> hybridation (A+B)	8 µl
<u>Second Hybrization Mix</u> 1 µl ADNc « driver » (digéré) 1 µl 4X Hybridization Buffer 2 µl eau DEPC	1 µl
Incubation	12h, 68°C
Dilution Buffer	200 µl
Incubation	5 min, 75°C

**Tableau 11 : Amplification des ADNc soustraits**

1 <sup>ère</sup> PCR	
<u>ADNc soustrait</u>	<u>1 µl</u>
<u>Eau DEPC</u>	<u>19,5 µl</u>
<u>10X PCR Reaction Buffer</u>	<u>2,5 µl</u>
<u>dNTP Mix (10 µM de chaque)</u>	<u>0,5 µl</u>
<u>PCR Primer 1 (10 µM)</u>	<u>1 µl</u>
<u>50X Advantage cDNA Polymerase Mix</u>	<u>0,5 µl</u>
<u>Incubation</u>	<u>5 min, 75°C</u>
<u>PCR (27 cycles)</u>	30s 94°C 30s 66°C 90s 72°C

PCR nichée		
Produit PCR (dilué au 1/10ème)	1 µl	
Eau DEPC	18,5 µl	
10X PCR Reaction Buffer	2,5 µl	
dNTP Mix (10 µM de chaque)	0,5 µl	
Nested PCR Primer 1 (10 µM)	1 µl	
Nested PCR Primer 2R (10 µM)	1 µl	
50X Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5 µl	
PCR (12 cycles)	30s 94°C 30s 66°C 90s 72°C	

#### 2. 4. 5. Clonage des ADNc soustraits

Après l'étape d'amplification, les ADNc ont été purifiés sur colonne Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) et clonés dans le vecteur pGEM-T® Easy Vector plasmid (Promega) (**tab. 12**). Le produit de ligation a été introduit par électroporation dans des bactéries compétentes (ElectroMAX™ DH10B Cells, Invitrogen). Pour cela, 1 µl de produit de ligation a été mélangé avec 200 µl de bactéries dans un microtube avant d'être transféré dans une cuve de 0,2 cm de large puis placé dans l'appareil à électroporation. Après transformation (2,0 kV, 200Ω, 25 µF), le mélange a été complété par 1 ml de milieu SOC (Invitrogen) puis placé en incubation (1 h, 37°C). Pendant cette période, les bactéries transformées expriment le gène de résistance à l'ampicilline présent dans le vecteur. Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu gélosé sélectif (LB + Agar) contenant de



l'ampicilline (100 µg/ml) où seules les bactéries transformées peuvent se développer. Le clonage dans le vecteur pGEM-T® Easy Vector plasmid permet également d'identifier les bactéries transformées par un vecteur contenant un insert et non un vecteur vide. En effet, le plasmide contient le gène *lacZ* codant la protéine β-galactosidase dont l'activité enzymatique entraîne l'hydrolyse d'un chromogène (X-gal) en un produit bleuté. Aussi, du X-gal (40 mg/ml) a été déposé sur le milieu gélosé. Lors de la ligation, l'insertion des ADNc se fait au niveau de la séquence codante de ce gène, bloquant ainsi son expression. Après incubation (12 h, 37°C), les bactéries transformées par un vecteur contenant un insert ont formé des colonies de couleur blanche tandis que celle qui ont été transformées par un vecteur vide ont formé des colonies de couleur bleu.

**Tableau 12 : Ligation des ADNc dans le vecteur**

ADNc soustraits et purifiés	2,5 µl
2X Rapid Ligation Buffer	10 µl
pGEM-T® Easy Vector (50 ng/µl)	1 µl
T4 DNA Ligase (3 unités/µl)	1 µl
Eau DEPC	5,5 µl
Incubation	60min, 20°C

#### 2. 4. 6. Extraction de l'ADN plasmidique et séquençage

Chaque colonie a été repiquée dans du milieu LB liquide (2 ml) contenant de l'ampicilline (100 µg/ml). Après incubation sous agitation (12 h, 37°C), l'ADN plasmidique a été extrait et purifié sur colonne Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) puis envoyé à séquencer (Beckman Coulter Genomics, Takeley, United Kingdom).

#### 2. 4. 7. Analyse des séquences et classification

Chaque séquence a été analysée manuellement afin d'éliminer les régions sans intérêt (queue polyA, site de restriction de Rsa I, et adaptateurs). Les séquences ainsi nettoyées ont ensuite été comparées aux banques protéiques via l'outil BlastX disponible sur le logiciel libre Blas2GO (<http://www.blast2go.com/b2ghome>).

## 2. 5. Interférence par ARN

La technique d'interférence par ARN permet d'étudier le rôle d'un gène en réduisant son expression de manière spécifique. Pour cela, un ARN double brin (ARNdb) spécifique du gène est synthétisé *in vitro* avant d'être injecté. Une fois injecté, cet ARNdb est dégradé par la protéine Dicer-2 pour former de petits fragments d'ARN simple brin qui vont s'hybrider aux ARNm du gène d'intérêt. Les duplex ainsi formés vont être dégradés par le complexe protéique RISC/Argonaute-2 de manière à réduire considérablement l'expression du gène d'intérêt (Li et al., 2013). L'efficacité de l'interférence par ARN a été contrôlée par RT-PCR quantitative. L'injection d'un ARNdb ciblant un gène exogène (GFP) a servi de contrôle permettant de vérifier la spécificité de l'interférence par ARN. Pour nos expériences, l'ARN double brin a été synthétisé en utilisant le kit MEGAscript® RNAi Kit (Ambion®).

### 2. 5. 1. *Synthèse de l'ARN double brin*

L'ARNdb a été synthétisé à partir d'un produit PCR purifié spécifique du gène d'intérêt (Hexamérine et Thiorédoxine peroxydase). Pour le gène codant la GFP, le produit PCR a été amplifié à partir du plasmide pW8 GFP. Pour chaque gène, les amorces utilisées (**tab. 6**) ont été choisies de manière à amplifier un fragment d'environ 300 pb. Ces amorces sont également flanquées des régions promotrices T7 (**TAATACGACTCACTATAGGG**) en 5' dont la présence au niveau des produits PCR permet la fixation de l'ARN polymérase ADN-dépendante T7. Une fois la synthèse achevée (**tab. 13**), l'ADN matrice et les ARN simple brin sont éliminés par traitement à la DNase et la RNase. Les ARNdb sont purifiés sur des colonnes fournies par le kit. Pour cela, les 50 µl d'ARNdb sont mélangés avec 50 µl de 10X Binding Buffer, 150 µl d'eau DEPC et 250 µl d'éthanol absolu avant d'être transférés sur colonne. Après centrifugation (10 000 g, 2 min), les colonnes sont lavées 2 fois avec 500 µl de Wash Solution. Après élution avec 100 µl d'Elution Solution (90°C), les ARNdb ont été dosés au NanoDrop® et précipités (2 h, -80°C) en ajoutant 10 µl d'acétate de sodium (3M, pH 5,2) et 250 µl d'éthanol absolu et froid (4°C). Après centrifugation (10 000 g, 15 min) le culot a été séché et repris dans de l'eau DEPC pour obtenir une concentration finale de 2 µg/µl de manière à injecter 200 ng d'ARNdb par insecte. Les ARNdb ont ensuite été aliquotés (10 µl/tube) et placés à -80°C avant d'être injectés.

**Tableau 13 : Synthèse des ARNdb**

Produit PCR purifiés (0,5 µg/µl)	8 µl
10X T7 Reaction Buffer	2 µl
ATP (75 nM)	2 µl
CTP (75 nM)	2 µl
GTP (75 nM)	2 µl
UTP (75 nM)	2 µl
T7 Enzyme Mix	2 µl
Incubation	4 h, 37°C
10X Digestion Buffer	5 µl
DNase I	2 µl
RNase	2 µl
Eau DEPC	21 µl
Incubation	60 min, 37°C

### 2. 5. 2. Vérification de l'efficacité de l'interférence par ARN

L'efficacité de l'interférence par ARN a été vérifiée par RT-PCR quantitative en temps réel en utilisant des amorces spécifiques (**tab. 6**). L'ARN total a été extrait 30 minutes et 6 jours après injection de l'ARNdb (Hexamérine, Thiorédoxine peroxydase et GFP). Les ADNc correspondant ont ensuite été synthétisés comme décrit précédemment avant de procéder à la PCR quantitative en temps réel. Pour chaque échantillon, le taux de transcrit des gènes d'intérêt a été évalué en comparant les Cts avec le gène de référence (tubuline-β).

## 3. Biologie cellulaire et biochimie

### 3. 1. Extraction et caractérisation des hémocytes circulants

Les hémocytes circulants ont été isolés à partir d'hémolymphe prélevée chez des insectes sains. Pour cela, 5 insectes ont été placés sur boîte de Pétri et recouvert d'une goutte (50 µl) de tampon PBS (Eurobio). L'abdomen a ensuite été disséqué à l'aide d'une loupe binoculaire de manière à libérer l'hémolymphe. Pour déterminer les différents types d'hémocytes présents chez *C. haematoceps*, l'hémolymphe a été placée entre lame et lamelle puis observée en contraste inter-différentiel sur un microscope optique (Axiophot, Zeiss). Pour isoler les hémocytes adhérents en revanche, un test d'adhésion a été réalisé. Pour cela, l'hémolymphe a été transférée sur lamelle de verre (Knittel Glass) dans un

puits de plaque de culture cellulaire, puis placée en chambre humide. Après incubation (2 h, 20°C), les hémocytes non-adhérents et les débris ont été éliminés par lavage en tampon PBS. Les hémocytes adhérents ainsi isolés ont été dénombrés et caractérisés par marquage fluorescent du noyau et du cytosquelette d'actine. Les traitements et lavages ont directement été réalisés dans le puits, à température ambiante. Dans un premier temps, les hémocytes adhérents ont été fixés avec 500 µl de paraformaldéhyde (4%). Après incubation (15 min), les hémocytes ont été lavés 3 fois en tampon PBS puis perméabilisés avec 500 µl de Triton X-100 (0,01%). Après incubation (10 min), les hémocytes ont été lavés et le cytosquelette d'actine a été marqué avec 200 µl de phalloïdine Alexa-568 (4 unités/ml, Invitrogen). Après incubation (1 h, à l'obscurité), les hémocytes ont été lavés et le noyau a été marqué avec 200 µl de DAPI (0,01 mg/ml, Sigma-Aldrich®). Après incubation (5 min, à l'obscurité), les hémocytes ont été lavés à l'eau et les lamelles de verre ont été séchées à l'obscurité avant d'être montées sur lame avec 5 µl de ProLong Gold Reagent (Invitrogen). Les lames ont été scellées puis observées au microscope à épifluorescence (Eclipse E800, Nikon). Les images obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Le nombre d'hémocytes adhérents a été estimé en comptant 100 champs de microscopie. Les granulocytes et les plasmotocytes ont été identifiés en comparant la taille du corps cellulaire et la morphologie du cytosquelette d'actine. Les hémocytes adhérents ont également été colorés au May-Grünwald Giemsa (Sigma-Aldrich®). Après avoir adhéré sur lamelle de verre, les hémocytes adhérents ont été fixés avec 500 µl de méthanol pur (30 s) puis colorés avec 500 µl d'une solution de May-Grünwald Giemsa (20 min, température ambiante). Les hémocytes ont ensuite été lavés à l'eau puis observés au microscope optique (Axiophot, Zeiss).

### 3. 2. Phagocytose et estimation du pourcentage d'hémocytes phagocytants

La capacité de phagocytose des hémocytes adhérents a été étudiée *in vivo*, en injectant des billes de latex (Latex beads carboxylate-modified polystyrene fluorescent yellow-green, Sigma-Aldrich®) ou des bactéries *E. coli* (DH5- $\alpha$ -DsRed) et *S. citri*. Avant l'injection, les billes ont été diluées au 1/200<sup>ème</sup> dans du tampon PBS de manière à obtenir une concentration similaire à celle des cultures bactériennes (10<sup>8</sup>/ml). Selon les expériences, les hémocytes adhérents ont été isolés 1, 3, 6 et 13 jours après injection. Le pourcentage

d'hémocytes phagocytant a été estimé en comptant 100 champs de microscopie. Un hémocyte dont le corps cellulaire contient au moins une particule est considéré comme phagocytant. Pour chaque hémocyte, le nombre de particules phagocytées a également été noté. La présence de *S. citri* dans les hémocytes a été révélée par marquage avec un anticorps polyclonal anti-spiraline (Duret et al., 2010b), dilué au 1/500<sup>ème</sup> en tampon PBS/BSA (1%). Ce marquage a été réalisé en même temps que celui du cytosquelette d'actine (1 h, à l'obscurité). Après lavage, les spiroplasmes ont été marqués avec un anticorps secondaire (Alexa-488 conjugate goat anti-rabbit antibodies, Thermo Fisher Scientific), dilué au 1/500<sup>ème</sup> en tampon PBS. Après incubation (30 min, à l'obscurité), les hémocytes ont été lavés avant d'être marqués au DAPI. Les billes de latex et les bactéries *E. coli* étant directement fluorescentes, aucun marquage n'est nécessaire. En revanche pour *E. coli*, le spectre d'émission du DsRed étant le même que celui de la phalloïdine Alexa-568, le cytosquelette d'actine n'a pas pu être marqué.

### 3. 3. Mise en évidence d'une activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été mesurée au niveau du plasma, chez des insectes sains et des insectes ayant subi une injection (milieu de culture ou bactéries). Pour cela, le plasma de 5 insectes a été isolé comme décrit précédemment, 24 h et 7 jours après injection. Pour chaque échantillon, le test d'inhibition de croissance a été réalisé en déposant 30 µl de plasma sur un disque d'antibiogramme disposé sur un tapis bactérien. Chaque tapis bactérien a été réalisé sur milieu gélosé (LB + Agar ou SP4 + Agar) en déposant 1 ml d'une culture à 10<sup>8</sup> bactéries/ml diluée au 1/5<sup>ème</sup> dans une solution de Top Agar (0,5 %) tiède (37°C). Après incubation (12 h, 37°C pour *E. coli* et *M. luteus* ou 7 j, 32°C pour *S. citri*), les diamètres d'inhibition ont été mesurés en soustrayant le diamètre du disque d'antibiogramme (5 mm).

### 3. 4. Mesure des activités phénoloxidase et pro-phénoloxidase

Les activités phénoloxidase et pro-phénoloxidase ont été mesurées au niveau du plasma et du surnageant de lysat hémocytaire (SLH), chez des insectes sains et des insectes ayant subi une injection de milieu de culture (LB, SP4), de bactéries (*E. coli*, *M. luteus* et *S. citri*) ou d'ARNdb (Hexamérine, Thiorédoxine peroxydase et GFP). Selon les expériences, les mesures ont été faites 30 minutes, 1, 3 et 6 jours après injection. Le protocole a été adapté des travaux réalisés chez *Gammarus pulex* (Cornet et al., 2009). L'hémolymph a été extraite à partir de 5 insectes avant d'être centrifugée (2500 g, 5 min) de manière à séparer le plasma et les hémocytes. Le plasma a ensuite été dilué au ¼ dans du tampon PBS froid (4°C) pour obtenir un volume final de 200 µl. Le culot hémocytaire a été repris dans 200 µl de tampon PBS froid avant de subir un choc thermique (10 min, -20°C puis 10 min, 37°C) pour obtenir le surnageant de lysat hémocytaire (SLH). Les mesures d'activités ont été réalisées à partir de 25 µl d'échantillon (plasma et SLH) dans un puits de plaque Elisa contenant 25 µl d'une solution de L-Dopamine (16 mg/ml, Sigma-Aldrich®) ainsi qu'une solution PO (12,5 % de tampon PBS dilué en eau, pH 6,5) pour obtenir un volume finale de 200 µl/puits. Pour l'activité pro-phénoloxidase, la solution PO contient de la trypsine (1 mg/ml). La dégradation de la L-dopamine a été suivie toutes les heures (pendant 16 heures) en mesurant l'absorbance à 490 nm avec le spectrophotomètre Epoch-Microplate Spectrophotometer (Biotech® Instrument, Inc, Winooski, Vermont USA). En parallèle, les activités phénoloxidase et pro-phénoloxidase ont été mesurées en présence d'un inhibiteur spécifique, soit 25 µl d'une solution de phénylthiourée (PTU) à différentes concentrations (2, 4 et 8 mg/ml). Une unité d'activité représente une augmentation de la densité optique (DO) de 0,001 par minute. L'activité a été calculée en prenant la partie linéaire de la courbe et correspond donc à la vitesse maximale (Vmax) de dégradation de la L-dopamine.

L'activité phénoloxidase a également été détectée au niveau des hémocytes adhérents. Pour cela, les hémocytes adhérents d'insectes sains ont été placés en incubation pendant 4 h à l'obscurité avec une solution d'éthanol (35%) contenant de la L-dopamine (16 mg/ml). Les hémocytes ont ensuite été lavés puis directement observés au microscope optique (Axiophot, Zeiss).



# **Bibliographie**



- Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593–623.
- Allaoui, A., Mounier, J., Prévost, M.C., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1992). *icsB*: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread. *Mol. Microbiol.* 6, 1605–1616.
- Altamiranda M, J., and Briñez R, B. (2011). Presence of *Spiroplasma penaei* in plankton, benthos and fauna in shrimps farms of Colombia. *Rev. MVZ Córdoba* 16, 2576–2583.
- Altincicek, B., Gross, J., and Vilcinskas, A. (2008a). Wounding-mediated gene expression and accelerated viviparous reproduction of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Mol. Biol.* 17, 711–716.
- Altincicek, B., Knorr, E., and Vilcinskas, A. (2008b). Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 585–595.
- Anbutsu, H., and Fukatsu, T. (2010). Evasion, suppression and tolerance of *Drosophila* innate immunity by a male-killing *Spiroplasma* endosymbiont. *Insect Mol. Biol.* 19, 481–488.
- Anselme, C., Vallier, A., Balmand, S., Fauvarque, M.-O., and Heddi, A. (2006). Host PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6766–6772.
- Anselme, C., Pérez-Brocal, V., Vallier, A., Vincent-Monegat, C., Charif, D., Latorre, A., Moya, A., and Heddi, A. (2008). Identification of the weevil immune genes and their expression in the bacteriome tissue. *BMC Biol.* 6, 43.
- Arockiaraj, J., Gnanam, A.J., Pothikasalam, G., Milton, J., Pasupuleti, M., Bhatt, P., Palanisamy, R., Kumaresan, V., Thirumalai, M.K., Arasu, A., et al. (2013). A novel prophenoloxidase, hemocyanin encoded copper containing active enzyme from prawn: Gene characterization. *Gene* 524, 139–151.
- Asling, B., Dushay, M.S., and Hultmark, D. (1995). Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 511–518.
- Axén, A., Carlsson, A., Engström, A., and Bennich, H. (1997). Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora* pupae. *Eur. J. Biochem. FEBS* 247, 614–619.
- Babior, B.M., Kipnes, R.S., and Curnutte, J.T. (1973). Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 52, 741–744.
- Baccan, G.C., Falleiros, A.M., Cavazzana, M., Jankevicius, J.V., Attias, M., De Souza, W., and Itow Jankevicius, S. (2001). *Veneza zonata* (Hemiptera: Coreidae)/trypanosomatid relationship: action of hemolymph in vitro and experimental infection. *J. Invertebr. Pathol.* 77, 158–164.
- Baeuerle, P.A., Rupec, R.A., and Pahl, H.L. (1996). Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol. Biol. (Paris)* 44, 29–35.
- Bahia, A.C., Oliveira, J.H.M., Kubota, M.S., Araujo, H.R.C., Lima, J.B.P., Rios-Velasquez, C.M., Lacerda, M.V.G., Oliveira, P.L., Traub-Cseko, Y.M., and Pimenta, P.F.P. (2013). The Role of Reactive Oxygen Species in *Anopheles aquasalis* Response to *Plasmodium vivax* Infection. *PLoS ONE* 8.

- Baxter, R.H.G., Chang, C.-I., Chelliah, Y., Blandin, S., Levashina, E.A., and Deisenhofer, J. (2007). Structural basis for conserved complement factor-like function in the antimalarial protein TEP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 11615–11620.
- Bébéar C. (1974). *Spiroplasma citri*: un mollicute. *Colloq Inst Natil Santé Rech Méd* 35–42.
- Berg, M., Melcher, U., and Fletcher, J. (2001). Characterization of *Spiroplasma citri* adhesion related protein SARP1, which contains a domain of a novel family designated sarpin. *Gene* *275*, 57–64.
- Berho, N., Duret, S., and Renaudin, J. (2006a). Absence of plasmids encoding adhesion-related proteins in non-insect-transmissible strains of *Spiroplasma citri*. *Microbiol. Read. Engl.* *152*, 873–886.
- Berho, N., Duret, S., Danet, J.-L., and Renaudin, J. (2006b). Plasmid pSci6 from *Spiroplasma citri* GII-3 confers insect transmissibility to the non-transmissible strain *S. citri* 44. *Microbiol. Read. Engl.* *152*, 2703–2716.
- Béven, L., Duret, S., Batailler, B., Dubrana, M.-P., Saillard, C., Renaudin, J., and Arricau-Bouvery, N. (2012). The repetitive domain of ScARP3d triggers entry of *Spiroplasma citri* into cultured cells of the vector *Circulifer haematocephus*. *PLoS One* *7*, e48606.
- Blandin, S., and Levashina, E.A. (2004). Thioester-containing proteins and insect immunity. *Mol. Immunol.* *40*, 903–908.
- Blandin, S., Shiao, S.-H., Moita, L.F., Janse, C.J., Waters, A.P., Kafatos, F.C., and Levashina, E.A. (2004). Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell* *116*, 661–670.
- Borges, A.R., Santos, P.N., Furtado, A.F., and Figueiredo, R.C.B.Q. (2008). Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Micron* *39*, 486–494.
- Boulanger, N., Munks, R.J.L., Hamilton, J.V., Vovelle, F., Brun, R., Lehane, M.J., and Bulet, P. (2002). Epithelial innate immunity. A novel antimicrobial peptide with antiparasitic activity in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *J. Biol. Chem.* *277*, 49921–49926.
- Boutareaud, A., Danet, J.L., Garnier, M., and Saillard, C. (2004). Disruption of a gene predicted to encode a solute binding protein of an ABC transporter reduces transmission of *Spiroplasma citri* by the leafhopper *Circulifer haematocephus*. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 3960–3967.
- Boutros, M., Agaisse, H., and Perrimon, N. (2002). Sequential Activation of Signaling Pathways during Innate Immune Responses in *Drosophila*. *Dev. Cell* *3*, 711–722.
- Bové, J.M. (1986). Stubborn and its natural transmission in the Mediterranean area and the Near East. *FAO Plant Prot. Bull.* *34*, 15–23.
- Bové, J.M. (1997). Spiroplasmas: infectious agents of plants, arthropods and vertebrates. *Wien. Klin. Wochenschr.* *109*, 604–612.
- Bové, J.M, Moutous, G., Saillard, C., Fos, A, Bonfils, J., Vignault, J.-C, Nhami, A., Abassi, M., Kabbage, K., Hafidi, B., et al. (1979). Mise en évidence de *Spiroplasma citri*, l'agent causal de la maladie du "st ubborn" des agrumes dans 7 cicadelles du Maroc. *Comptes Rendus Hebd. Séances Académie Sci. D* *288*, 335–338.

- Breton, M., Duret, S., Danet, J.-L., Dubrana, M.-P., and Renaudin, J. (2010). Sequences essential for transmission of *Spiroplasma citri* by its leafhopper vector, *Circulifer haematiceps*, revealed by plasmid curing and replacement based on incompatibility. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3198–3205.
- Breugelmans, B., Simonet, G., van Hoef, V., Van Soest, S., and Vanden Broeck, J. (2009). Pacifastin-related peptides: Structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. *Peptides* 30, 622–632.
- Brown, D.R., Whitcomb, R.F., and Bradbury, J.M. (2007). Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2703–2719.
- Browne, N., Heelan, M., and Kavanagh, K. (2013). An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* 4, 597–603.
- Brumell, J.H., Tang, P., Zaharik, M.L., and Finlay, B.B. (2002). Disruption of the *Salmonella*-containing vacuole leads to increased replication of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in the cytosol of epithelial cells. *Infect. Immun.* 70, 3264–3270.
- Buchon, N., Poidevin, M., Kwon, H.-M., Guillou, A., Sottas, V., Lee, B.-L., and Lemaitre, B. (2009). A single modular serine protease integrates signals from pattern-recognition receptors upstream of the *Drosophila* Toll pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 12442–12447.
- Bulet, P., Dimarcq, J.L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorsselaer, A., and Hoffmann, J.A. (1993). A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J. Biol. Chem.* 268, 14893–14897.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L., and Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 329–344.
- Burge, E.J., Burnett, L.E., and Burnett, K.G. (2009). Time-course analysis of peroxinectin mRNA in the shrimp *Litopenaeus vannamei* after challenge with *Vibrio campbellii*. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 603–609.
- Burmester, T. (2001). Molecular Evolution of the Arthropod Hemocyanin Superfamily. *Mol. Biol. Evol.* 18, 184–195.
- Burmester, T. (2002). Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J. Comp. Physiol. B* 172, 95–107.
- Burmester, T., and Schellen, K. (1996). Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor. *J. Mol. Evol.* 42, 713–728.
- Burmester, T., Holman C. Massey, J., Zakharkin, S.O., and Benes, H. (1998). The Evolution of Hexamerins and the Phylogeny of Insects. *J. Mol. Evol.* 47, 93–108.
- Campbell, B.C., Steffen-Campbell, J.D., Sorensen, J.T., and Gill, R.J. (1995). Paraphyly of Homoptera and Auchenorrhyncha inferred from 18S rDNA nucleotide sequences. *Syst. Entomol.* 20, 175–194.
- Carle, P., Laigret, F., Tully, J.G., and Bové, J.M. (1995). Heterogeneity of genome sizes within the genus *Spiroplasma*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 178–181.

- Carlsson, A., Engström, P., Palva, E.T., and Bennich, H. (1991). Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with *omp* gene transcription. *Infect. Immun.* *59*, 3040–3045.
- Carlsson, A., Nyström, T., de Cock, H., and Bennich, H. (1998). Attacin--an insect immune protein--binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis. *Microbiol. Read. Engl.* *144 ( Pt 8)*, 2179–2188.
- Caselín-Castro, S., Llanderal-Cázares, C., de Jesús Méndez-Gallegos, S., Ramírez-Cruz, A., and de la Cruz Hernández-Hernández, F. (2010). Hemocytes of the cochineal insect: ultrastructure. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* *73*, 176–192.
- Cerenius, L., Lee, B.L., and Söderhäll, K. (2008). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* *29*, 263–271.
- Charoensapsri, W., Amparyup, P., Hirono, I., Aoki, T., and Tassanakajon, A. (2009). Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. *Dev. Comp. Immunol.* *33*, 811–820.
- Chen, C., Rowley, A.F., Newton, R.P., and Ratcliffe, N.A. (1999). Identification, purification and properties of a beta-1,3-glucan-specific lectin from the serum of the cockroach, *Blaberus discoidalis* which is implicated in immune defence reactions. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *122*, 309–319.
- Chen, H., Yin, Y., Li, Y., Mahmud, M.S., and Wang, Z. (2012). Identification and analysis of genes differentially expressed in the *Spodoptera litura* fat body in response to the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *163*, 203–210.
- Chen, H., Yin, Y., Feng, E., Li, Y., Xie, X., and Wang, Z. (2014). Thioredoxin peroxidase gene is involved in resistance to biocontrol fungus *Nomuraea rileyi* in *Spodoptera litura*: gene cloning, expression, localization and function. *Dev. Comp. Immunol.* *44*, 76–85.
- Chetty, P.S., Arrese, E.L., and Soulages, J.L. (2003a). In vivo lipoprotein binding assay of the insect exchangeable apolipoprotein, apolipophorin-III. *Protein Pept. Lett.* *10*, 469–473.
- Chetty, P.S., Arrese, E.L., Rodriguez, V., and Soulages, J.L. (2003b). Role of helices and loops in the ability of apolipophorin-III to interact with native lipoproteins and form discoidal lipoprotein complexes. *Biochemistry (Mosc.)* *42*, 15061–15067.
- Choe, K.-M., Werner, T., Stöven, S., Hultmark, D., and Anderson, K.V. (2002). Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science* *296*, 359–362.
- Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., et al. (2002). Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* *298*, 159–165.
- Clark, T.B. (1982). Spiroplasmas: diversity of arthropod reservoirs and host-parasite relationships. *Science* *217*, 57–59.
- Clark, K.D., Witherell, A., and Strand, M.R. (1998). Plasmacyte spreading peptide is encoded by an mRNA differentially expressed in tissues of the moth *Pseudoplusia includens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *250*, 479–485.

Clark, T.B., Whitcomb, R.F., Tully, J.G., Mouches, C., Saillard, C., BOVé, J.M., Wróblewski, H., Carle, P., Rose, D.L., Henegar, R.B., et al. (1985). *Spiroplasma melliferum*, a New Species from the Honeybee (*Apis mellifera*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 296–308.

Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, C., Hoffmann, J.A., and Letellier, L. (1993). Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**, 19239–19245.

Cociancich, S., Dupont, A., Hegy, G., Lanot, R., Holder, F., Hetru, C., Hoffmann, J.A., and Bulet, P. (1994). Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*. *Biochem. J.* **300** ( Pt 2), 567–575.

Cole, R.M., Tully, J.G., Popkin, T.J., and Bové, J.M. (1973). Morphology, ultrastructure, and bacteriophage infection of the helical mycoplasma-like organism (*Spiroplasma citri* gen. nov., sp. nov.) cultured from “stubborn” disease of citrus. *J. Bacteriol.* **115**, 367–384.

Colinet, D., Dubuffet, A., Cazes, D., Moreau, S., Drezen, J.-M., and Poirié, M. (2009). A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. *Dev. Comp. Immunol.* **33**, 681–689.

Contreras, E., Rausell, C., and Real, M.D. (2013). *Tribolium castaneum* Apolipophorin-III acts as an immune response protein against *Bacillus thuringiensis* Cry3Ba toxic activity. *J. Invertebr. Pathol.* **113**, 209–213.

Cornet, B., Bonmatin, J.M., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Ptak, M., and Vovelle, F. (1995). Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **3**, 435–448.

Cornet, S., Biard, C., and Moret, Y. (2009). Variation in immune defence among populations of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Oecologia* **159**, 257–269.

Costechareyre, D., Chich, J.-F., Strub, J.-M., Rahbé, Y., and Condemine, G. (2013). Transcriptome of *Dickeya dadantii* infecting *Acyrtosiphon pisum* reveals a strong defense against antimicrobial peptides. *PLoS One* **8**, e54118.

Cruz, C.E., Fogaça, A.C., Nakayasu, E.S., Angeli, C.B., Belmonte, R., Almeida, I.C., Miranda, A., Miranda, M.T.M., Tanaka, A.S., Braz, G.R., et al. (2010). Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. *Parasit. Vectors* **3**, 63.

Davis, and Worley (1973). *Spiroplasma motile* helical microorganism associated with corn stunt disease.

Dean, P., Potter, U., Richards, E.H., Edwards, J.P., Charnley, A.K., and Reynolds, S.E. (2004). Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* **50**, 1027–1036.

DeLotto, Y., and DeLotto, R. (1998). Proteolytic processing of the *Drosophila* Spätzle protein by easter generates a dimeric NGF-like molecule with ventralising activity. *Mech. Dev.* **72**, 141–148.

Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., et al. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6025–6030.

- Dimarcq, J.L., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hoffmann, D., and Reichhart, J.M. (1990). Insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipterin, in *Phormia terranova*. *EMBO J.* 9, 2507–2515.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., and Asuyama, H. (1967). Mycoplasma- or PLT Group-like Microorganisms Found in the Phloem Elements of Plants Infected with Mulberry Dwarf, Potato Witches' Broom, Aster Yellows, or Paulownia Witches' Broom. *Jpn. J. Phytopathol.* 33, 259–266.
- Dong, Y., Taylor, H.E., and Dimopoulos, G. (2006). AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biol.* 4, e229.
- Drazen, D.L., and Nelson, R.J. (2001). Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology* 74, 178–184.
- Du, J., Zhu, H., Liu, P., Chen, J., Xiu, Y., Yao, W., Wu, T., Ren, Q., Meng, Q., Gu, W., et al. (2013). Immune responses and gene expression in hepatopancreas from *Macrobrachium rosenbergii* challenged by a novel pathogen *Spiroplasma* MR-1008. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 315–323.
- Duret, S., Berho, N., Danet, J.-L., Garnier, M., and Renaudin, J. (2003). Spiralin is not essential for helicity, motility, or pathogenicity but is required for efficient transmission of *Spiroplasma citri* by its leafhopper vector *Circulifer haematocaps*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6225–6234.
- Duret, S., Batailler, B., Danet, J.-L., Béven, L., Renaudin, J., and Arricau-Bouvery, N. (2010a). Infection of the *Circulifer haematocaps* cell line Ciha-1 by *Spiroplasma citri*: the non-insect-transmissible strain 44 is impaired in invasion. *Microbiol. Read. Engl.* 156, 1097–1107.
- Duret, S., Batailler, B., Danet, J.-L., Béven, L., Renaudin, J., and Arricau-Bouvery, N. (2010b). Infection of the *Circulifer haematocaps* cell line Ciha-1 by *Spiroplasma citri*: the non-insect-transmissible strain 44 is impaired in invasion. *Microbiol. Read. Engl.* 156, 1097–1107.
- Duret, S., Batailler, B., Dubrana, M.-P., Saillard, C., Renaudin, J., Béven, L., and Arricau-Bouvery, N. (2014). Invasion of insect cells by *Spiroplasma citri* involves spiralin relocalization and lectin/glycoconjugate-type interactions. *Cell. Microbiol.* 16, 1119–1132.
- Dushay, M.S. (2009). Insect hemolymph clotting. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 2643–2650.
- Dziarski, R. (2004). Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol. Immunol.* 40, 877–886.
- El Chamy, L., Leclerc, V., Caldelari, I., and Reichhart, J.-M. (2008). Sensing of “danger signals” and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways “upstream” of Toll. *Nat. Immunol.* 9, 1165–1170.
- Fallon, J.P., Troy, N., and Kavanagh, K. (2011). Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence* 2, 413–421.
- Fang, Q., Wang, L., Zhu, J., Li, Y., Song, Q., Stanley, D.W., Akhtar, Z.-R., and Ye, G. (2010). Expression of immune-response genes in lepidopteran host is suppressed by venom from an endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. *BMC Genomics* 11, 484.
- Farries, T.C., and Atkinson, J.P. (1991). Evolution of the complement system. *Immunol. Today* 12, 295–300.

- Fehlbaum, P., Bulet, P., Chernysh, S., Briand, J.P., Roussel, J.P., Letellier, L., Hetru, C., and Hoffmann, J.A. (1996). Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1221–1225.
- Ferrandon, D., Imler, J.-L., and Hoffmann, J.A. (2004). Sensing infection in *Drosophila*: Toll and beyond. *Semin. Immunol.* **16**, 43–53.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811.
- Fletcher, J., and Wayadanda, A. (2002). Fastidious Vascular-Colonizing Bacteria. *Plant Health Instr.*
- Foissac, X., Saillard, C., Gandar, J., Zreik, L., and Bové, J.M. (1996). Spiralin polymorphism in strains of *Spiroplasma citri* is not due to differences in posttranslational palmitoylation. *J. Bacteriol.* **178**, 2934–2940.
- Fos, A., Bové, J.M., Lallemand, J., Saillard, C., Vignault, J.C., Ali, Y., Brun, P., and Vogel, R. (1986). The leafhopper *Neolaliturus haematoceps* is a vector of *Spiroplasma citri* in the Mediterranean area. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **137A**, 97–101.
- Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J., and Ezekowitz, R.A. (1996). Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4**, 431–443.
- Franc, N.C., Heitzler, P., Ezekowitz, R.A., and White, K. (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* **284**, 1991–1994.
- Franssens, V., Simonet, G., Breugelmans, B., Van Soest, S., Van Hoef, V., and Vanden Broeck, J. (2008). The role of hemocytes, serine protease inhibitors and pathogen-associated patterns in prophenoloxidase activation in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Peptides* **29**, 235–241.
- Freeman, B.A., Sissenstein, R., McManus, T.T., Woodward, J.E., Lee, I.M., and Mudd, J.B. (1976). Lipid composition and lipid metabolism of *Spiroplasma citri*. *J. Bacteriol.* **125**, 946–954.
- Fujita, T., Matsushita, M., and Endo, Y. (2004). The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunol. Rev.* **198**, 185–202.
- Gandhe, A.S., John, S.H., and Nagaraju, J. (2007). Noduler, a novel immune up-regulated protein mediates nodulation response in insects. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 6943–6951.
- Gasparich, G.E. (2010). Spiroplasmas and phytoplasmas: microbes associated with plant hosts. *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.* **38**, 193–203.
- Gasparich, G.E., Whitcomb, R.F., Dodge, D., French, F.E., Glass, J., and Williamson, D.L. (2004). The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 893–918.
- Gaurivaud, P., Danet, J.L., Laigret, F., Garnier, M., and Bové, J.M. (2000). Fructose utilization and phytopathogenicity of *Spiroplasma citri*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **13**, 1145–1155.
- Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (2001). *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Dev. Cell* **1**, 503–514.

Gerardo, N.M., Altincicek, B., Anselme, C., Atamian, H., Barribeau, S.M., Vos, M. de, Duncan, E.J., Evans, J.D., Gabaldón, T., Ghanim, M., et al. (2010). Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Genome Biol.* *11*, R21.

Gesellchen, V., Kutenkeuler, D., Steckel, M., Pelte, N., and Boutros, M. (2005). An RNA interference screen identifies Inhibitor of Apoptosis Protein 2 as a regulator of innate immune signalling in *Drosophila*. *EMBO Rep.* *6*, 979–984.

Glazer, L., Tom, M., Weil, S., Roth, Z., Khalaila, I., Mittelman, B., and Sagi, A. (2013). Hemocyanin with phenoxidase activity in the chitin matrix of the crayfish gastrolith. *J. Exp. Biol.* *216*, 1898–1904.

Golino, D.A., and Oldfield, G.N. (1990). Plant pathogenic spiroplasmas and their leafhopper vectors. *267–299*.

Gorman, M.J., An, C., and Kanost, M.R. (2007). Characterization of tyrosine hydroxylase from *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *37*, 1327–1337.

Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J.A., Ferrandon, D., and Royet, J. (2002). The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* *416*, 640–644.

Gottar, M., Gobert, V., Matskevich, A.A., Reichhart, J.-M., Wang, C., Butt, T.M., Belvin, M., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D. (2006). Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell* *127*, 1425–1437.

De Gregorio, E., Han, S.-J., Lee, W.-J., Baek, M.-J., Osaki, T., Kawabata, S.-I., Lee, B.-L., Iwanaga, S., Lemaitre, B., and Brey, P.T. (2002). An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev. Cell* *3*, 581–592.

GregoryDD Hurst, FrancisM Jiggins, and MichaelEN Majerus (2003). Inherited Microorganisms That Selectively Kill Male Hosts. In *Insect Symbiosis*, (CRC Press), pp. 177–198.

Guillou, F., Mitta, G., Galinier, R., and Coustau, C. (2007). Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.* *31*, 657–671.

Gupta, L., Noh, J.Y., Jo, Y.H., Oh, S.H., Kumar, S., Noh, M.Y., Lee, Y.S., Cha, S.-J., Seo, S.J., Kim, I., et al. (2010a). Apolipophorin-III mediates antiplasmodial epithelial responses in *Anopheles gambiae* (G3) mosquitoes. *PloS One* *5*, e15410.

Gupta, L., Noh, J.Y., Jo, Y.H., Oh, S.H., Kumar, S., Noh, M.Y., Lee, Y.S., Cha, S.-J., Seo, S.J., Kim, I., et al. (2010b). Apolipophorin-III mediates antiplasmodial epithelial responses in *Anopheles gambiae* (G3) mosquitoes. *PloS One* *5*, e15410.

Ha, E.-M., Lee, K.-A., Seo, Y.Y., Kim, S.-H., Lim, J.-H., Oh, B.-H., Kim, J., and Lee, W.-J. (2009). Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in *drosophila* gut. *Nat. Immunol.* *10*, 949–957.

Hackett, K.J., Lynn, D.E., Williamson, D.L., Ginsberg, A.S., and Whitcomb, R.F. (1986). Cultivation of the *Drosophila* sex-ratio spiroplasma. *Science* *232*, 1253–1255.



- Halwani, A.E., Niven, D.F., and Dunphy, G.B. (2000). Apolipophorin-III and the interactions of lipoteichoic acids with the immediate immune responses of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **76**, 233–241.
- Hara, S., and Yamakawa, M. (1995). A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. J.* **310** ( Pt 2), 651–656.
- Hartenstein, V., and Jan, Y.N. (1992). Studying *Drosophila* embryogenesis with P-lacZ enhancer trap lines. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **201**, 194–220.
- Harumoto, T., Anbutsu, H., and Fukatsu, T. (2014). Male-Killing *Spiroplasma* Induces Sex-Specific Cell Death via Host Apoptotic Pathway. *PLoS Pathog* **10**, e1003956.
- Hattori, M., Konishi, H., Tamura, Y., Konno, K., and Sogawa, K. (2005). Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *J. Insect Physiol.* **51**, 1359–1365.
- Heddi, A., Vallier, A., Anselme, C., Xin, H., Rahbe, Y., and Wäckers, F. (2005). Molecular and cellular profiles of insect bacteriocytes: mutualism and harm at the initial evolutionary step of symbiogenesis. *Cell. Microbiol.* **7**, 293–305.
- Herren, J.K., and Lemaitre, B. (2011). *Spiroplasma* and host immunity: activation of humoral immune responses increases endosymbiont load and susceptibility to certain Gram-negative bacterial pathogens in *Drosophila melanogaster*. *Cell. Microbiol.* **13**, 1385–1396.
- Herren, J.K., Paredes, J.C., Schüpfer, F., and Lemaitre, B. (2013). Vertical transmission of a *Drosophila* endosymbiont via cooption of the yolk transport and internalization machinery. *mBio* **4**.
- Hillyer, J.F., Schmidt, S.L., and Christensen, B.M. (2003a). Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and plasmodium sporozoites by hemocytes of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Parasitol.* **89**, 62–69.
- Hillyer, J.F., Schmidt, S.L., and Christensen, B.M. (2003b). Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. *Cell Tissue Res.* **313**, 117–127.
- Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.-M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.* **3**, 121–126.
- Holak, T.A., Engström, A., Kraulis, P.J., Lindeberg, G., Bennich, H., Jones, T.A., Gronenborn, A.M., and Clore, G.M. (1988). The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry (Mosc.)* **27**, 7620–7629.
- Horng, T., and Medzhitov, R. (2001). *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 12654–12658.
- Van der Horst, D.J., Roosendaal, S.D., and Rodenburg, K.W. (2009). Circulatory lipid transport: lipoprotein assembly and function from an evolutionary perspective. *Mol. Cell. Biochem.* **326**, 105–119.
- Hu, S., and Yang, X. (2000). dFADD, a novel death domain-containing adapter protein for the *Drosophila* caspase DREDD. *J. Biol. Chem.* **275**, 30761–30764.

- Huber, R. (1980). Spatial structure of immunoglobulin molecules. *Klin. Wochenschr.* 58, 1217–1231.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., and Boman, H.G. (1980). Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem. FEBS* 106, 7–16.
- Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., Kapur, R., and Boman, H.G. (1982). Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia* pupae. *Eur. J. Biochem. FEBS* 127, 207–217.
- Hultmark, D., Engström, A., Andersson, K., Steiner, H., Bennich, H., and Boman, H.G. (1983). Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* 2, 571–576.
- Hultmark D. (1996). Insect lysozymes. *EXS* 7587–102.
- Hurst, G.D., and Jiggins, F.M. (2000). Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications. *Emerg. Infect. Dis.* 6, 329–336.
- Hurst, G.D.D., Anbutsu, H., Kutsukake, M., and Fukatsu, T. (2003). Hidden from the host: *Spiroplasma* bacteria infecting *Drosophila* do not cause an immune response, but are suppressed by ectopic immune activation. *Insect Mol. Biol.* 12, 93–97.
- Hutchence, K.J., Fischer, B., Paterson, S., and Hurst, G.D.D. (2011). How do insects react to novel inherited symbionts? A microarray analysis of *Drosophila melanogaster* response to the presence of natural and introduced *Spiroplasma*. *Mol. Ecol.* 20, 950–958.
- Idakieva, K., Raynova, Y., Meersman, F., and Gielens, C. (2013). Phenoloxidase activity and thermostability of *Cancer pagurus* and *Limulus polyphemus* hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 164, 201–209.
- Iwona Wojda, P.K. (2009). Humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae after infection by *Beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions. *J. Insect Physiol.* 55, 525–531.
- Jaenike, J., Unckless, R., Cockburn, S.N., Boelio, L.M., and Perlman, S.J. (2010). Adaptation via Symbiosis: Recent Spread of a *Drosophila* Defensive Symbiont. *Science* 329, 212–215.
- Jang, I.-H., Chosa, N., Kim, S.-H., Nam, H.-J., Lemaitre, B., Ochiai, M., Kambris, Z., Brun, S., Hashimoto, C., Ashida, M., et al. (2006). A Spätzle-processing enzyme required for toll signaling activation in *Drosophila* innate immunity. *Dev. Cell* 10, 45–55.
- Jarosch, B., Collins, N.C., Zellerhoff, N., and Schaffrath, U. (2005). RAR1, ROR1, and the actin cytoskeleton contribute to basal resistance to *Magnaporthe grisea* in barley. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 18, 397–404.
- Jarosz, J. (1993). Induction kinetics of immune antibacterial proteins in pupae of *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 106, 415–421.
- Jeffroy, F., Brulle, F., and Paillard, C. (2013). Differential expression of genes involved in immunity and biomineralization during Brown Ring Disease development and shell repair in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *J. Invertebr. Pathol.* 113, 129–136.
- Jiang, H., Wang, Y., Ma, C., and Kanost, M.R. (1997). Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 835–850.

Jiang, H., Vilcinskas, A., and Kanost, M.R. (2010). Immunity in lepidopteran insects. *Adv. Exp. Med. Biol.* 708, 181–204.

Jollès, P., and Jollès, J. (1984). What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol. Cell. Biochem.* 63, 165–189.

Kambris, Z., Brun, S., Jang, I.-H., Nam, H.-J., Romeo, Y., Takahashi, K., Lee, W.-J., Ueda, R., and Lemaitre, B. (2006). *Drosophila* immunity: a large-scale in vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation. *Curr. Biol.* CB 16, 808–813.

Kang, D., Liu, G., Lundström, A., Gelius, E., and Steiner, H. (1998). A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10078–10082.

Kanost, M.R. (1999). Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 291–301.

K Fraser Clark, A.R.A. (2012). Differential expression of American lobster (*Homarus americanus*) immune related genes during infection of *Aerococcus viridans* var. *homari*, the causative agent of Gaffkemia. *J. Invertebr. Pathol.*

Killiny, N., Castroviejo, M., and Saillard, C. (2005). *Spiroplasma citri* Spiralin Acts In Vitro as a Lectin Binding to Glycoproteins from Its Insect Vector *Circulifer haematocaps*. *Phytopathology* 95, 541–548.

Killiny, N., Batailler, B., Foissac, X., and Saillard, C. (2006). Identification of a *Spiroplasma citri* hydrophilic protein associated with insect transmissibility. *Microbiol. Read. Engl.* 152, 1221–1230.

Kim, H.J., Je, H.J., Park, S.Y., Lee, I.H., Jin, B.R., Yun, H.K., Yun, C.Y., Han, Y.S., Kang, Y.J., and Seo, S.J. (2004). Immune activation of apolipophorin-III and its distribution in hemocyte from *Hyphantria cunea*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1011–1023.

Kim, M.-S., Byun, M., and Oh, B.-H. (2003). Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nat. Immunol.* 4, 787–793.

Kim, Y.S., Ryu, J.H., Han, S.J., Choi, K.H., Nam, K.B., Jang, I.H., Lemaitre, B., Brey, P.T., and Lee, W.J. (2000). Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J. Biol. Chem.* 275, 32721–32727.

Kingsolver, M.B., Huang, Z., and Hardy, R.W. (2013). Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *J. Mol. Biol.* 425, 4921–4936.

Kirchhoff, H., Heitmann, J., and Trautwein, G. (1981). Pathogenicity of *Spiroplasma* sp. strain SMCA in rabbits: clinical, microbiological, and histological aspects. *Infect. Immun.* 33, 292–296.

Klein, M., Rasooly, P., and Raccach, B. (1988). New findings on the transmission of *Spiroplasma citri*, the citrus stubborn disease agent in Israel, by a beet leafhopper from the Jordan valley. *Hassadeh* 68, 1736–1737.

Kleino, A., Valanne, S., Ulvila, J., Kallio, J., Myllymäki, H., Enwald, H., Stöven, S., Poidevin, M., Ueda, R., Hultmark, D., et al. (2005). Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway. *EMBO J.* 24, 3423–3434.

Kocks, C., Cho, J.H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A.M., Meister, M., Strom, C., Conto, S.L., Hetru, C., Stuart, L.M., et al. (2005). Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 123, 335–346.

Koizumi, N., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K., Iwahana, H., and Sato, R. (1999). The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS Lett.* 443, 139–143.

Komano, H., Mizuno, D., and Natori, S. (1980). Purification of lectin induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae on injury. *J. Biol. Chem.* 255, 2919–2924.

Krol, R.M., Hawkins, W.E., and Overstreet, R.M. (1991). Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J. Invertebr. Pathol.* 57, 362–370.

Kuchel, R.P., Raftos, D.A., Birch, D., and Vella, N. (2010). Haemocyte morphology and function in the Akoya pearl oyster, *Pinctada imbricata*. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 36–48.

Kuroda, Y., Shimada, Y., Sakaguchi, B., and Oishi, K. (1992). Effects of Sex-Ratio (SR)-Spiroplasma Infection on *Drosophila* Primary Embryonic Cultured Cells and on Embryogenesis (Cell and Molecular Biology). *Zoolog. Sci.* 9, 283–291.

Kurucz, E., Márkus, R., Zsámboki, J., Folkl-Medzihradzsky, K., Darula, Z., Vilmos, P., Udvardy, A., Krausz, I., Lukacsovich, T., Gateff, E., et al. (2007). Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr. Biol. CB* 17, 649–654.

Kwon, M.O., Wayadande, A.C., and Fletcher, J. (1999a). Spiroplasma citri Movement into the Intestines and Salivary Glands of Its Leafhopper Vector, *Circulifer tenellus*. *Phytopathology* 89, 1144–1151.

Kwon, M.O., Wayadande, A.C., and Fletcher, J. (1999b). Spiroplasma citri Movement into the Intestines and Salivary Glands of Its Leafhopper Vector, *Circulifer tenellus*. *Phytopathology* 89, 1144–1151.

Kwon, Y.M., Kim, H.J., Kim, Y.I., Kang, Y.J., Lee, I.H., Jin, B.R., Han, Y.S., Cheon, H.M., Ha, N.G., and Seo, S.J. (2008). Comparative analysis of two attacin genes from *Hyphantria cunea*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 151, 213–220.

Labroussaa, F., Arricau-Bouvery, N., Dubrana, M.-P., and Saillard, C. (2010). Entry of Spiroplasma citri into *Circulifer haematoceps* cells involves interaction between spiroplasma phosphoglycerate kinase and leafhopper actin. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1879–1886.

Labroussaa, F., Dubrana, M.-P., Arricau-Bouvery, N., Béven, L., and Saillard, C. (2011). Involvement of a minimal actin-binding region of Spiroplasma citri phosphoglycerate kinase in spiroplasma transmission by its leafhopper vector. *PloS One* 6, e17357.

Laflèche, D., and Bové, J.M. (1970). Mycoplasmas in Citrus affected by greening, stubborn or similar diseases. *Fruits Outre Mer* 25, 455–465.

Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E.A., Capovilla, M., and Hoffmann, J.A. (2000). Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11427–11432.

Lallemand, J. (1987). Contribution à l'étude de la transmission par des homoptères d'agents phytopathogènes. Bordeaux.

Lamprou, I., Mamali, I., Dallas, K., Fertakis, V., Lampropoulou, M., and Marmaras, V.J. (2007). Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocytes. *Immunology* *121*, 314–327.

Landon, C., Sodano, P., Hetru, C., Hoffmann, J., and Ptak, M. (1997). Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *6*, 1878–1884.

Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., and Meister, M. (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *230*, 243–257.

Laughton, A.M., Garcia, J.R., Altincicek, B., Strand, M.R., and Gerardo, N.M. (2011). Characterisation of immune responses in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* *57*, 830–839.

Lavine, M.D., and Strand, M.R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *32*, 1295–1309.

Lee, W.J., Lee, J.D., Kravchenko, V.V., Ulevitch, R.J., and Brey, P.T. (1996). Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 7888–7893.

Lee, Y.S., Yun, E.K., Jang, W.S., Kim, I., Lee, J.H., Park, S.Y., Ryu, K.S., Seo, S.J., Kim, C.H., and Lee, I.H. (2004). Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Insect Mol. Biol.* *13*, 65–72.

Lerchl, J., Geigenberger, P., Stitt, M., and Sonnewald, U. (1995). Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. *Plant Cell* *7*, 259–270.

Levashina, E.A., Ohresser, S., Bulet, P., Reichhart, J.M., Hetru, C., and Hoffmann, J.A. (1995). Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur. J. Biochem. FEBS* *233*, 694–700.

Levashina, E.A., Moita, L.F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M., and Kafatos, F.C. (2001). Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* *104*, 709–718.

Levenbook, L., and Bauer, A.C. (1984). The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of *Calliphora vicina*. *Insect Biochem.* *14*, 77–86.

Li, J., Wang, X.-P., Wang, M.-Q., Ma, W.-H., and Hua, H.-X. (2013). Advances in the use of the RNA interference technique in Hemiptera. *Insect Sci.* *20*, 31–39.

Li, Z., Zhang, S., and Liu, Q. (2008). Vitellogenin Functions as a Multivalent Pattern Recognition Receptor with an Opsonic Activity. *PLoS ONE* *3*.

Liang, T., Li, X., Du, J., Yao, W., Sun, G., Dong, X., Liu, Z., Ou, J., Meng, Q., Gu, W., et al. (2011a). Identification and isolation of a spiroplasma pathogen from diseased freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*, in China: A new freshwater crustacean host. *Aquaculture* *318*, 1–6.

- Liang, T., Li, X., Du, J., Yao, W., Sun, G., Dong, X., Liu, Z., Ou, J., Meng, Q., Gu, W., et al. (2011b). Identification and isolation of a spiroplasma pathogen from diseased freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*, in China: A new freshwater crustacean host. *Aquaculture* 318, 1–6.
- Liao, C.H. (1977). Culture of Corn Stunt Spiroplasma in a Simple Medium. *Phytopathology* 77, 802.
- Lin, Y.-C., Vaseeharan, B., and Chen, J.-C. (2008). Identification and phylogenetic analysis on lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1260–1269.
- Ling, E., and Yu, X.-Q. (2005). Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 1356–1366.
- Liu, H.-Y. (1983). Transmission of *Spiroplasma citri* by *Circulifer tenellus*. *Phytopathology*.
- Liu, C., Xu, Z., Gupta, D., and Dziarski, R. (2001). Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *J. Biol. Chem.* 276, 34686–34694.
- Liu, F., Ling, E., and Wu, S. (2009). Gene expression profiling during early response to injury and microbial challenges in the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 72, 16–33.
- Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, I., and Söderhäll, K. (2007). Phenoloxidase Is an Important Component of the Defense against *Aeromonas hydrophila* Infection in a Crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 282, 33593–33598.
- Liu, Q.-N., Zhu, B.-J., Wang, L., Wei, G.-Q., Dai, L.-S., Lin, K.-Z., Sun, Y., Qiu, J.-F., Fu, W.-W., and Liu, C.-L. (2013). Identification of immune response-related genes in the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* by suppression subtractive hybridization. *J. Invertebr. Pathol.* 114, 313–323.
- Lowenberger, C., Bulet, P., Charlet, M., Hetru, C., Hodgeman, B., Christensen, B.M., and Hoffmann, J.A. (1995). Insect immunity: isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 867–873.
- Mackintosh, J.A., Gooley, A.A., Karuso, P.H., Beattie, A.J., Jardine, D.R., and Veal, D.A. (1998). A gloverin-like antibacterial protein is synthesized in *Helicoverpa armigera* following bacterial challenge. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 387–399.
- Malogolowkin, C., and Poulson, D.F. (1957). Infective Transfer of Maternally Inherited Abnormal Sex-Ratio in *Drosophila willistoni*. *Science* 126, 32–32.
- Markham, P.G. (1983). Spiroplasmas in leafhoppers: a review. *Yale J. Biol. Med.* 56, 745–751.
- Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 670–684.
- McManus, A.M., Otvos, L., Hoffmann, R., and Craik, D.J. (1999). Conformational studies by NMR of the antimicrobial peptide, drosocin, and its non-glycosylated derivative: effects of glycosylation on solution conformation. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 705–714.
- Mello, A.F.S., Wayadande, A.C., Yokomi, R.K., and Fletcher, J. (2009). Transmission of different isolates of *Spiroplasma citri* to carrot and citrus by *Circulifer tenellus* (Hemiptera: Cicadellidae). *J. Econ. Entomol.* 102, 1417–1422.

- Mellroth, P., Karlsson, J., and Steiner, H. (2003). A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 7059–7064.
- Meng, Q., Li, W., Liang, T., Jiang, X., Gu, W., and Wang, W. (2010). Identification of adhesin-like protein ALP41 from *Spiroplasma eriocheiris* and induction immune response of *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* **29**, 587–593.
- Meng, Q., Hou, L., Zhao, Y., Huang, X., Huang, Y., Xia, S., Gu, W., and Wang, W. (2014). iTRAQ-based proteomic study of the effects of *Spiroplasma eriocheiris* on Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **40**, 182–189.
- Michel, T., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., and Royet, J. (2001). *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* **414**, 756–759.
- Mishima, H., Hasebe, H., Kondo, K., and Fujita, H. (1979). Fine structural demonstration of tyrosinase activity in the retinal pigment epithelium of normal and PTU-treated chick embryos. *Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* **211**, 1–10.
- Mohrig W, Messner B. (1968). Lysozyme als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrgeschehen. *Biol Zentralbl.*
- Moncrieffe, M.C., Grossmann, J.G., and Gay, N.J. (2008). Assembly of Oligomeric Death Domain Complexes during Toll Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* **283**, 33447–33454.
- Mouches, C., Bové, J.M., Tully, J.G., Rose, D.L., McCoy, R.E., Carle-Junca, P., Garnier, M., and Saillard, C. (1983). *Spiroplasma apis*, a new species from the honey-bee *Apis mellifera*. *Ann. Microbiol. (Paris)* **134A**, 383–397.
- Mudd, J.B., Ittig, M., Roy, B., Latrille, J., and Bové, J.M. (1977). Composition and enzyme activities of *Spiroplasma citri* membranes. *J. Bacteriol.* **129**, 1250–1256.
- Muffat, J., Walker, D.W., and Benzer, S. (2008). Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7088–7093.
- Mukhopadhyay, S., and Gordon, S. (2004). The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology* **209**, 39–49.
- Naitza, S., Rossé, C., Kappler, C., Georgel, P., Belvin, M., Gubb, D., Camonis, J., Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.M. (2002). The *Drosophila* immune defense against gram-negative infection requires the death protein dFADD. *Immunity* **17**, 575–581.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279–289.
- Nappi, A.J., and Ottaviani, E. (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **22**, 469–480.
- Nimmo, D.D., Ham, P.J., Ward, R.D., and Maingon, R. (1997). The sandfly *Lutzomyia longipalpis* shows specific humoral responses to bacterial challenge. *Med. Vet. Entomol.* **11**, 324–328.

- Nunan, L.M., Pantoja, C.R., Salazar, M., Aranguren, F., and Lightner, D.V. (2004). Characterization and molecular methods for detection of a novel spiroplasma pathogenic to *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Organ.* **62**, 255–264.
- Nunan, L.M., Lightner, D.V., Oduori, M.A., and Gasparich, G.E. (2005). *Spiroplasma penaei* sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 2317–2322.
- Ochiai, M., and Ashida, M. (1988). Purification of a beta-1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **263**, 12056–12062.
- Otvos, L. (2002). The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **59**, 1138–1150.
- Ozbek, E., Miller, S.A., Meulia, T., and Hogenhout, S.A. (2003). Infection and replication sites of *Spiroplasma kunkelii* (Class: Mollicutes) in midgut and Malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis*. *J. Invertebr. Pathol.* **82**, 167–175.
- Pace, K.E., and Baum, L.G. (2004). Insect galectins: roles in immunity and development. *Glycoconj. J.* **19**, 607–614.
- Page, A.L., Ohayon, H., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1999). The secreted IpaB and IpaC invasins and their cytoplasmic chaperone IpgC are required for intercellular dissemination of *Shigella flexneri*. *Cell. Microbiol.* **1**, 183–193.
- Park, J.M., Brady, H., Ruocco, M.G., Sun, H., Williams, D., Lee, S.J., Kato, T., Richards, N., Chan, K., Mercurio, F., et al. (2004). Targeting of TAK1 by the NF- $\kappa$ B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in *Drosophila*. *Genes Dev.* **18**, 584–594.
- Pauchet, Y., Freitag, D., Heidel-Fischer, H.M., Heckel, D.G., and Vogel, H. (2009). Immunity or digestion: glucanase activity in a glucan-binding protein family from *Lepidoptera*. *J. Biol. Chem.* **284**, 2214–2224.
- Pearson, A.M. (1996). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 20–28.
- Piao, S., Song, Y.-L., Kim, J.H., Park, S.Y., Park, J.W., Lee, B.L., Oh, B.-H., and Ha, N.-C. (2005). Crystal structure of a clip-domain serine protease and functional roles of the clip domains. *EMBO J.* **24**, 4404–4414.
- Piao, S., Kim, S., Kim, J.H., Park, J.W., Lee, B.L., and Ha, N.-C. (2007). Crystal structure of the serine protease domain of prophenoloxidase activating factor-I. *J. Biol. Chem.* **282**, 10783–10791.
- Poirier, A.C., Schmitt, P., Rosa, R.D., Vanhove, A.S., Kieffer-Jaquinod, S., Rubio, T.P., Charrière, G.M., and Destoumieux-Garzón, D. (2014). Antimicrobial Histones and DNA Traps in Invertebrate Immunity EVIDENCES IN CRASSOSTREA GIGAS. *J. Biol. Chem.* **289**, 24821–24831.
- Poulson, D.F., and Sakaguchi, B. (1961). Nature of “Sex-ratio” Agent in *Drosophila*. *Science* **133**, 1489–1490.
- Pratt, C.C., and Weers, P.M.M. (2004). Lipopolysaccharide binding of an exchangeable apolipoprotein, apolipoprotein III, from *Galleria mellonella*. *Biol. Chem.* **385**, 1113–1119.



- Qiu, P., Pan, P.C., and Govind, S. (1998). A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 1909–1920.
- Rada, B., and Leto, T.L. (2008). Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib. Microbiol.* *15*, 164–187.
- Radyuk, S.N., Sohal, R.S., and Orr, W.C. (2003). Thioredoxin peroxidases can foster cytoprotection or cell death in response to different stressors: over- and under-expression of thioredoxin peroxidase in *Drosophila* cells. *Biochem. J.* *371*, 743–752.
- Ramakers, B.P., Riksen, N.P., van der Hoeven, J.G., Smits, P., and Pickkers, P. (2011). Modulation of innate immunity by adenosine receptor stimulation. *Shock Augusta Ga* *36*, 208–215.
- Rämet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., and Ezekowitz, R.A.B. (2002). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* *416*, 644–648.
- Ran, Y., Liu, T.-T., Zhou, Q., Li, S., Mao, A.-P., Li, Y., Liu, L.-J., Cheng, J.-K., and Shu, H.-B. (2011). SENP2 negatively regulates cellular antiviral response by deSUMOylating IRF3 and conditioning it for ubiquitination and degradation. *J. Mol. Cell Biol.* *3*, 283–292.
- Ratcliffe, N.A., and Gagen, S.J. (1977). Studies on the in vivo cellular reactions of insects: An ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue Cell* *9*, 73–85.
- Rawlings, J.S., Rosler, K.M., and Harrison, D.A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* *117*, 1281–1283.
- Razin, S., Hasin, M., Ne’eman, Z., and Rottem, S. (1973). Isolation, Chemical Composition, and Ultrastructural Features of the Cell Membrane of the Mycoplasma-Like Organism *Spiroplasma citri*. *J. Bacteriol.* *116*, 1421–1435.
- Regassa, L.B., and Gasparich, G.E. (2006). Spiroplasmas: evolutionary relationships and biodiversity. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *11*, 2983–3002.
- Ridley, F. (1928). Lysozyme: An Antibacterial Body present in Great Concentration in Tears, and its Relation to Infection of the Human Eye. *Proc. R. Soc. Med.* *21*, 1495–1506.
- Rifflet, A., Gavalda, S., Téné, N., Orivel, J., Leprince, J., Guilhaudis, L., Génin, E., Vétillard, A., and Treilhou, M. (2012). Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from the venom of the ant *Tetramorium bicarinatum*. *Peptides* *38*, 363–370.
- Rop, O., Mlcek, J., and Jurikova, T. (2009). Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutr. Rev.* *67*, 624–631.
- Ross, J., Jiang, H., Kanost, M.R., and Wang, Y. (2003). Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene* *304*, 117–131.
- Rowley, A.F., and Ratcliffe, N.A. (1976). The granular cells of *Galleria mellonella* during clotting and phagocytic reactions in vitro. *Tissue Cell* *8*, 437–446.

Saglio (1971). Isolement, culture et observation au microscope électronique des structures de type mycoplasme associées à la maladie du stubborn des agrumes et leur comparaison avec les structures observées dans le cas de la maladie du greening des agrumes. *Physiol Veg.*

Saglio, P., Lhospital, M., Lafèche, D., Dupont, G., Bové, J.M., Tully, J.G., and Freundt, E.A. (1973). *Spiroplasma citri* gen. and sp. n.: A Mycoplasma-Like Organism Associated with “Stubborn” Disease of Citrus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23, 191–204.

Saillard, C. (1987). *Spiroplasma phoeniceum* sp. nov. a New Plant-Pathogenic Species from Syria.

Sakaguchi, B., and Poulson, D.F. (1961). Distribution of “sex-ratio” agent in tissues of *Drosophila willistoni*. *Genetics* 46, 1665–1676.

Satyavathi, V.V., Minz, A., and Nagaraju, J. (2014). Nodulation: an unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cell. Signal.* 26, 1753–1763.

Saul, S.J., Bin, L., and Sugumaran, M. (1987). The majority of prophenoloxidase in the hemolymph of *Manduca sexta* is present in the plasma and not in the hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 11, 479–485.

Scheller, K., Fischer, B., and Schenkel, H. (1990). Molecular Properties, Functions and Developmentally Regulated Biosynthesis of Arylphorin in *Calliphora vicina*. In *Molecular Insect Science*, H.H. Hagedorn, J.G. Hildebrand, M.G. Kidwell, and J.H. Law, eds. (Springer US), pp. 155–162.

Schmidt, O., Söderhäll, K., Theopold, U., and Faye, I. (2010). Role of adhesion in arthropod immune recognition. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 485–504.

Schmitz, A., Anselme, C., Ravallec, M., Rebuf, C., Simon, J.-C., Gatti, J.-L., and Poirié, M. (2012). The cellular immune response of the pea aphid to foreign intrusion and symbiotic challenge. *PLoS One* 7, e42114.

Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E., and Zipursky, S.L. (2000). *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* 101, 671–684.

Schott, K., Gütlich, M., and Ziegler, I. (1993). Induction of GTP-cyclohydrolase I mRNA expression by lectin activation and interferon-gamma treatment in human cells associated with the immune response. *J. Cell. Physiol.* 156, 12–16.

Sela-Culang, I., Kunik, V., and Ofran, Y. (2013). The structural basis of antibody-antigen recognition. *Front. Immunol.* 4, 302.

Shahabuddin, M., Fields, I., Bulet, P., Hoffmann, J.A., and Miller, L.H. (1998). *Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin. *Exp. Parasitol.* 89, 103–112.

Shao, B.-M., Dai, H., Xu, W., Lin, Z.-B., and Gao, X.-M. (2004). Immune receptors for polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 133–141.

Shelby, K.S. (2013). Functional Immunomics of the Squash Bug, *Anasa tristis* (De Geer) (Heteroptera: Coreidae). *Insects* 4, 712–730.

- Simonet, G., Claeys, I., Huybrechts, J., De Loof, A., and Broeck, J.V. (2003). Bacterial production and purification of SGPI-1 and SGPI-2, two peptidic serine protease inhibitors from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Protein Expr. Purif.* **31**, 188–196.
- Smith, L.M., and May, R.C. (2013). Mechanisms of microbial escape from phagocyte killing. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 475–490.
- Söderhäll, K., and Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 23–28.
- Son, Y., and Kim, Y. (2011). Immunosuppression induced by entomopathogens is rescued by addition of apolipophorin III in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* **106**, 217–222.
- Song, C.J., Seo, S., Shrestha, S., and Kim, Y. (2011). Bacterial metabolites of an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibit a catalytic activity of phenoloxidase of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 317–322.
- Stoven, S., Silverman, N., Junell, A., Hedengren-Olcott, M., Erturk, D., Engstrom, Y., Maniatis, T., and Hultmark, D. (2003). Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5991–5996.
- Stuart, L.M., Deng, J., Silver, J.M., Takahashi, K., Tseng, A.A., Hennessy, E.J., Ezekowitz, R.A.B., and Moore, K.J. (2005). Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* **170**, 477–485.
- Sumida, M., Ichimori, H., Yuhki, T., Mori, H., and Matsubara, F. (1992). Induction of antibacterial activity in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, by injection of formalin-treated *Escherichia coli* K-12 in the anterior and posterior body part of the ligated larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B* **101**, 173–178.
- Sun, H., Bristow, B.N., Qu, G., and Wasserman, S.A. (2002). A heterotrimeric death domain complex in Toll signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12871–12876.
- Sun, S.C., Lindström, I., Lee, J.Y., and Faye, I. (1991). Structure and expression of the attacin genes in *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem. FEBS* **196**, 247–254.
- Takahasi, K., Ochiai, M., Horiuchi, M., Kumeta, H., Ogura, K., Ashida, M., and Inagaki, F. (2009). Solution structure of the silkworm  $\beta$ GRP/GNBP3 N-terminal domain reveals the mechanism for  $\beta$ -1,3-glucan-specific recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 11679–11684.
- Takata, K., Shimanouchi, K., Yamaguchi, M., Murakami, S., Ishikawa, G., Takeuchi, R., Kanai, Y., Ruike, T., Nakamura, R., Abe, Y., et al. (2004). Damaged DNA binding protein 1 in *Drosophila* defense reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 1024–1031.
- Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T., and Kurata, S. (2002). Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13705–13710.
- Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J.A., and Imler, J.-L. (2002). *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nat. Immunol.* **3**, 91–97.

- Terwilliger, N.B. (2007). Hemocyanins and the immune response: defense against the dark arts. *Integr. Comp. Biol.* 47, 662–665.
- Theopold, U., Rissler, M., Fabbri, M., Schmidt, O., and Natori, S. (1999). Insect glycobiology: a lectin multigene family in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 923–927.
- Theopold, U., Li, D., Fabbri, M., Scherfer, C., and Schmidt, O. (2002). The coagulation of insect hemolymph. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 59, 363–372.
- Tong, Z., Li, L., Pawar, R., and Zhang, S. (2010). Vitellogenin is an acute phase protein with bacterial-binding and inhibiting activities. *Immunobiology* 215, 898–902.
- Toubarro, D., Avila, M.M., Hao, Y., Balasubramanian, N., Jing, Y., Montiel, R., Faria, T.Q., Brito, R.M., and Simões, N. (2013). A Serpin Released by an Entomopathogen Impairs Clot Formation in Insect Defense System. *PLoS ONE* 8, e69161.
- Towb, P., Bergmann, A., and Wasserman, S.A. (2001). The protein kinase Pelle mediates feedback regulation in the *Drosophila* Toll signaling pathway. *Development* 128, 4729–4736.
- Tully, J.G., Whitcomb, R.F., Bove, J.M., and Saglio, P. (1973). Plant Mycoplasmas: Serological Relation between Agents Associated with Citrus Stubborn and Corn Stunt Diseases. *Science* 182, 827–829.
- Tzou, P., De Gregorio, E., and Lemaitre, B. (2002). How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 102–110.
- Ursic-Bedoya, R.J., and Lowenberger, C.A. (2007). *Rhodnius prolixus*: Identification of immune-related genes up-regulated in response to pathogens and parasites using suppressive subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 109–120.
- Valanne, S., Kleino, A., Myllymäki, H., Vuoristo, J., and Rämet, M. (2007). *lap2* is required for a sustained response in the *Drosophila* Imd pathway. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 991–1001.
- Vargas-Albores, F., and Yepiz-Plascencia, G. (2000). Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191, 13–21.
- Via, L.E., Deretic, D., Ulmer, R.J., Hibler, N.S., Huber, L.A., and Deretic, V. (1997). Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by *rab5* and *rab7*. *J. Biol. Chem.* 272, 13326–13331.
- Vignault J. C. (1980a). Mise en culture de spiroplasmes à partir de matériel végétal et d'insectes provenant des pays circum méditerranéens et du Prochet Orient. *C R Acad Sci Paris*.
- Vignault J. C. (1980b). Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D, Sciences naturelles (Gauthier-Villars (Paris)).
- Wang, X.-W., and Wang, J.-X. (2013). Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 981–989.
- Wang, Z., and Haunerland, N.H. (1994). Receptor-mediated endocytosis of storage proteins by the fat body of *Helicoverpa zea*. *Cell Tissue Res.* 278, 107–115.

- Wang, J., Sykes, B.D., and Ryan, R.O. (2002a). Structural basis for the conformational adaptability of apolipoprotein III, a helix-bundle exchangeable apolipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 1188–1193.
- Wang, W., Zhu, N., Gu, Z., Du, K., and Xu, Z. (2002b). Study on the transmission of tremor disease (TD) in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *J. Invertebr. Pathol.* **81**, 202–204.
- Wang, W., Rong, L., Gu, W., Du, K., and Chen, J. (2003). Study on experimental infections of *Spiroplasma* from the Chinese mitten crab in crayfish, mice and embryonated chickens. *Res. Microbiol.* **154**, 677–680.
- Wang, W., Wen, B., Gasparich, G.E., Zhu, N., Rong, L., Chen, J., and Xu, Z. (2004a). A *spiroplasma* associated with tremor disease in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Microbiology* **150**, 3035–3040.
- Wang, W., Chen, J., Du, K., and Xu, Z. (2004b). Morphology of *spiroplasmas* in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* associated with tremor disease. *Res. Microbiol.* **155**, 630–635.
- Wang, W., Gu, W., Gasparich, G.E., Bi, K., Ou, J., Meng, Q., Liang, T., Feng, Q., Zhang, J., and Zhang, Y. (2011). *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov., associated with mortality in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 703–708.
- Watson, F.L., Püttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D.L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V.I., and Schmucker, D. (2005). Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* **309**, 1874–1878.
- Weber, A.N.R., Tauszig-Delamasure, S., Hoffmann, J.A., Lelièvre, E., Gascan, H., Ray, K.P., Morse, M.A., Imler, J.-L., and Gay, N.J. (2003). Binding of the *Drosophila* cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nat. Immunol.* **4**, 794–800.
- Weers, P.M.M., and Ryan, R.O. (2006). Apolipoprotein III: role model apolipoprotein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**, 231–240.
- Weers, P.M., Van Der Horst, D.J., and Ryan, R.O. (2000). Interaction of locust apolipoprotein III with lipoproteins and phospholipid vesicles: effect of glycosylation. *J. Lipid Res.* **41**, 416–423.
- Wei, Y., Xiao, Q., Zhang, T., Mou, Z., You, J., and Ma, W.-J. (2009). Differential regulation of mRNA stability controls the transient expression of genes encoding *Drosophila* antimicrobial peptide with distinct immune response characteristics. *Nucleic Acids Res.* **37**, 6550–6561.
- Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., and Van Etten, J. (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol.* **171**, 6455–6467.
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., and Hultmark, D. (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13772–13777.
- Whitcomb, R.F. (1979). *The Mycoplasmas V3: Plant and Insects Mycoplasmas* (Elsevier).
- Whitcomb, R.F., and Williamson, D.L. (1975). HELICAL WALL-FREE PROKARYOTES IN INSECTS: MULTIPLICATION AND PATHOGENICITY. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **266**, 260–275.

- Whitcomb, R.F., Tully, J.G., Bové, J.M., and Saglio, P. (1973). Spiroplasmas and achleoplasmas: multiplication in insects. *Science* **182**, 1251–1253.
- Whitcomb, R.F., Tully, J.G., and Wróblewski, H. (1983). Spiralin: Major membrane protein specific for subgroup I-1 Spiroplasmas. *Curr. Microbiol.* **9**, 7–12.
- Whitten, M.M.A., Tew, I.F., Lee, B.L., and Ratcliffe, N.A. (2004). A novel role for an insect apolipoprotein (apolipophorin III) in beta-1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 2177–2185.
- Williamson, D.L., Sakaguchi, B., Hackett, K.J., Whitcomb, R.F., Tully, J.G., Carle, P., Bové, J.M., Adams, J.R., Konai, M., and Henegar, R.B. (1999). *Spiroplasma poulsonii* sp. nov., a new species associated with male-lethality in *Drosophila willistoni*, a neotropical species of fruit fly. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49 Pt 2**, 611–618.
- Wróblewski, H., Johansson, K.E., and Hjérten, S. (1977). Purification and characterization of spiralin, the main protein of the *Spiroplasma citri* membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **465**, 275–289.
- Wu, L.P., and Anderson, K.V. (1998). Regulated nuclear import of Rel proteins in the *Drosophila* immune response. *Nature* **392**, 93–97.
- Xiao, T., Towb, P., Wasserman, S.A., and Sprang, S.R. (1999). Three-dimensional structure of a complex between the death domains of Pelle and Tube. *Cell* **99**, 545–555.
- Xiao, X., Liu, Y., Zhang, X., Wang, J., Li, Z., Pang, X., Wang, P., and Cheng, G. (2014). Complement-related proteins control the flavivirus infection of *Aedes aegypti* by inducing antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.* **10**, e1004027.
- Yassine, H., and Osta, M.A. (2010). *Anopheles gambiae* innate immunity. *Cell. Microbiol.* **12**, 1–9.
- Yi, H.-Y., Chowdhury, M., Huang, Y.-D., and Yu, X.-Q. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 5807–5822.
- Yoshida, H., Kinoshita, K., and Ashida, M. (1996). Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **271**, 13854–13860.
- Yu, X.Q., and Kanost, M.R. (2000). Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* **275**, 37373–37381.
- Yu, J., Wayadande, A.C., and Fletcher, J. (2000). *Spiroplasma citri* Surface Protein P89 Implicated in Adhesion to Cells of the Vector *Circulifer tenellus*. *Phytopathology* **90**, 716–722.
- Yu, X.Q., Gan, H., and Kanost, M.R. (1999). Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**, 585–597.
- Yu, X.-Q., Zhu, Y.-F., Ma, C., Fabrick, J.A., and Kanost, M.R. (2002). Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 1287–1293.
- Zdybicka-Barabas, A., Palusińska-Szys, M., Gruszecki, W.I., Mak, P., and Cytryńska, M. (2014). *Galleria mellonella* apolipophorin III - an apolipoprotein with anti-*Legionella pneumophila* activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 2689–2697.

Zelensky, A.N., and Gready, J.E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 272, 6179–6217.

Zhang, Y., Liu, X., Zhang, W., and Han, R. (2010). Differential gene expression of the honey bees *Apis mellifera* and *A. cerana* induced by *Varroa destructor* infection. *J. Insect Physiol.* 56, 1207–1218.

Zhu, H., Du, J., Hui, K.-M., Liu, P., Chen, J., Xiu, Y., Yao, W., Wu, T., Meng, Q., Gu, W., et al. (2013). Diversity of lectins in *Macrobrachium rosenbergii* and their expression patterns under *spiroplasma* MR-1008 stimulation. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 300–309.

Zibae, A., Bandani, A.R., Talaei-Hassanlouei, R., and Malagoli, D. (2011). Cellular Immune Reactions of the Sunn Pest, *Eurygaster integriceps*, to the Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* and Its Secondary Metabolites. *J. Insect Sci.* 11.

# **Annexes**



**Annexe 1: Tableau récapitulatif des ESTs non-redondantes des banques de soustraction de *C. haematoceps***

Clones	Banques	Nom	Accession	Organismes	E-Value
<b>Transcription, Traduction et Réplication</b>					
170_T7P_74	<i>S. citri</i>	40S ribosomal protein S23	AEL79183	<i>Rhodnius prolixus</i>	2,00E-47
SSH_T7P_72	<i>M. luteus</i> <i>S. citri</i>	conserved hypothetical protein	XP_002426457	<i>Pediculus humanus corporis</i>	6,15E-61
380_T7P_92	<i>S. citri</i>	60S acidic ribosomal protein P0	ACY69932	<i>Cimex lectularius</i>	3,04E-39
109_T7P_13	<i>M. luteus</i>	elongation factor 2	AEV89753	<i>Schistocerca gregaria</i>	1,35E-68
279_T7P_85	<i>E. coli</i> <i>M. luteus</i> <i>S. citri</i>	elongation factor-1 alpha	AAF29897	<i>Chiasmus sp.</i>	5,80E-105
CIC_44.fa	<i>S. citri</i>	GJ11194	XP_002058767	<i>Drosophila virilis</i>	6,00E-77
683_T7P_65	<i>M. luteus</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27C, putative	XP_002424159	<i>Pediculus humanus corporis</i>	2,86E-09
215_T7P_23	<i>S. citri</i>	histone H3 (AA 1-58)	CAA31968	<i>Medicago sativa</i>	1,23E-16
144_T7P_48	<i>S. citri</i>	phosphate carrier protein, putative	XP_002423242	<i>Pediculus humanus corporis</i>	2,05E-37
289_T7P_1	<i>E. coli</i> <i>S. citri</i>	Polyadenylate-binding protein 1	EFN85399	<i>Harpegnathos saltator</i>	9,65E-49
235_T7P_43	<i>S. citri</i>	PREDICTED: 40S ribosomal protein S8-like	XP_003699508	<i>Megachile rotundata</i>	1,07E-74
114_T7P_18	<i>S. citri</i>	PREDICTED: 60S ribosomal protein L18-like	XP_003707499	<i>Megachile rotundata</i>	6,51E-95
75_T7P_75	<i>S. citri</i>	PREDICTED: 60S ribosomal protein L26-like	XP_003705919	<i>Megachile rotundata</i>	1,93E-19
480_T7P_81	<i>M. luteus</i>	PREDICTED: 60S ribosomal protein L27-like isoform 1	XP_003394705	<i>Bombus terrestris</i>	2,73E-08
85_T7P_85	<i>S. citri</i>	PREDICTED: 60S ribosomal protein L35-like	XP_003702500	<i>Megachile rotundata</i>	1,18E-42
SSH_T7P_87	<i>M. luteus</i>	PREDICTED: DNA damage-binding protein 1-like	XP_003395809	<i>Bombus terrestris</i>	1,54E-61
284_T7P_5	<i>M. luteus</i>	PREDICTED: similar to AT08455p	XP_968223	<i>Tribolium castaneum</i>	1,00E-30
359_T7P_71	<i>S. citri</i>	putative ribosomal protein S4e	ABD98758	<i>Graphocephala atropunctata</i>	6,53E-79
311_T7P_23	<i>S. citri</i>	putative ribosomal protein S7e	ABD98780	<i>Graphocephala atropunctata</i>	8,14E-47
252_T7P_60	<i>S. citri</i>	ribosomal protein L13	ABM55445	<i>Xenopsylla cheopis</i>	1,91E-20
46_T7P_46	<i>S. citri</i>	ribosomal protein L31	ACY95330	<i>Manduca sexta</i>	2,74E-25
66_T7P_66	<i>S. citri</i>	ribosomal protein S12	ACY71277	<i>Chrysomela tremula</i>	1,54E-34
CIC_92.fa	<i>S. citri</i>	unknown	AEE63462	<i>Dendroctonus ponderosae</i>	1,45E-48
<b>Transport</b>					
339_T7P_51	<i>S. citri</i>	arylphorin subunit alpha	XP_001849286	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1,78E-11

291_T7P_3	<i>S. citri</i> <i>E. coli</i>	hemocyanin subunit	XP_321436	<i>Anopheles gambiae</i>	7,07E-16
274_T7P_82	<i>S. citri</i> <i>E. coli</i>	hexamerin	AAD40236	<i>Apis mellifera</i>	8,24E-52
SSH_T7P_35	<i>M. luteus</i>	PREDICTED: apolipophorins-like	XP_003491784	<i>Bombus impatiens</i>	4,84E-14
34_T7P_34	<i>S. citri</i>	PREDICTED: facilitated trehalose transporter Tret1-1-like	XP_003697088	<i>Apis florea</i>	3,25E-09
CIC_84.fa	<i>S. citri</i>	PREDICTED: protein transport protein Sec61 subunit beta-like	XP_001599008	<i>Nasonia vitripennis</i>	6,29E-51
174_T7P_52	<i>M. luteus</i>	PREDICTED: similar to apolipoprotein D	XP_971031	<i>Tribolium castaneum</i>	1,66E-41
336_T7P_48	<i>S. citri</i>	PREDICTED: vesicle-trafficking protein SEC22b-like, partial	XP_003729207	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	1,72728
619_T7P_40	<i>M. luteus</i>	putative ferritin	AAU95196	<i>Oncometopia nigricans</i>	4,67E-86
286_T7P_92	<i>E. coli</i> <i>M. luteus</i> <i>S. citri</i>	vitellogenin	AAZ06771	<i>Homalodisca vitripennis</i>	7,38E-106
306_T7P_18	<i>S. citri</i>	white-brown-complex ABC transporter family	XP_002326363	<i>Populus trichocarpa</i>	0,269666
<b>Respiration</b>					
299_T7P_11	<i>S. citri</i>	ACYPI001113	BAH72322	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	2,24E-31
262_T7P_68	<i>E. coli</i> <i>S. citri</i>	AF176697_1cytochrome c oxidase subunit II	AAD54319	<i>Circulifer tenellus</i>	5,54E-56
360_T7P_47	<i>M. luteus</i>	AGAP010429-PA	XP_311518	<i>Anopheles gambiae</i>	5,87E-89
351_T7P_63	<i>S. citri</i>	cytochrome c-like protein	ABD98769	<i>Graphocephala atropunctata</i>	2,13E-43
401_T7P_32	<i>E. coli</i> <i>M. luteus</i> <i>S. citri</i>	cytochrome oxidase subunit I	ABR26439	<i>Platycotis sp.</i>	1,21E-71
SSH_T7P_59	<i>M. luteus</i> <i>S. citri</i>	NADH dehydrogenase	NP_001164305	<i>Tribolium castaneum</i>	4,42E-32
525_T7P_9	<i>M. luteus</i>	PREDICTED: citrate synthase, mitochondrial-like, partial	XP_001516746	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	4,09E-72
320_T7P_91	<i>M. luteus</i> <i>S. citri</i>	putative ADP/ATP translocase	ADY39509	<i>Hottentotta judaicus</i>	5,51E-46
31_T7P_31	<i>S. citri</i>	Uncharacterized FAD-dependent dehydrogenase	ZP_01253255	<i>Psychroflexus torquis</i>	3,22854
<b>Métabolisme</b>					
35_T7P_35	<i>S. citri</i>	26S protease regulatory subunit S10b	XP_001649399	<i>Aedes aegypti</i>	1,72E-73
329_T7P_41	<i>S. citri</i>	PREDICTED: aminopeptidase N-like	XP_003229864	<i>Anolis carolinensis</i>	1,27E-33
160_T7P_64	<i>S. citri</i>	PREDICTED: membrane metallo-endopeptidase-like 1-like	XP_003701340	<i>Megachile rotundata</i>	5,72E-40

227_T7P_35	<i>S. citri</i>	PREDICTED: protein takeout-like	XP_001950724	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	1,78E-13
135_T7P_39	<i>S. citri</i>	PREDICTED: similar to conserved hypothetical protein	XP_970116	<i>Tribolium castaneum</i>	5,66E-36
56_T7P_56	<i>S. citri</i>	retinoid-inducible serine carboxypeptidase (serine carboxypeptidase)	XP_001652055	<i>Aedes aegypti</i>	4,04E-22
43_T7P_43	<i>S. citri</i>	PREDICTED: iron-sulfur cluster assembly 1 homolog, mitochondrial-like isoform 1	XP_001608294	<i>Nasonia vitripennis</i>	7,39E-14
92_T7P_92	<i>S. citri</i>	AGAP011107-PA	XP_309539	<i>Anopheles gambiae</i>	3,26E-43
304_T7P_75	<i>M. luteus</i>	predicted protein	BAK02675	<i>Hordeum vulgare</i>	3,80E-26
214_T7P_20	<i>E. coli</i>	AF176696_1ATP synthase A chain subunit 6	AAD54318	<i>Circulifer tenellus</i>	4,44E-39
220_T7P_26	<i>E. coli</i> <i>S. citri</i>	putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AAU95199	<i>Oncometopia nigricans</i>	1,84E-55
148_T7P_37	<i>M. luteus</i>	thioredoxin peroxidase	ACO36036	<i>Scylla paramamosain</i>	2,22E-37
CIC_61.fa	<i>S. citri</i>	PREDICTED: tyrosine 3-monooxygenase-like	XP_001944964	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	3,11E-10
98_T7P_2	<i>S. citri</i>	AF338465_1delta-9 desaturase 1	AAK25796	<i>Acheta domesticus</i>	1,52E-14
CIC_77.fa	<i>S. citri</i>	ACYPI007678	BAH71749	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	5,74E-08
83_T7P_83	<i>S. citri</i>	aldehyde oxidase	XP_001864335	<i>Culex quinquefasciatus</i>	6,44E-33
259_T7P_94	<i>M. luteus</i>	aldose reductase, putative	XP_002426861	<i>Pediculus humanus corporis</i>	8,24E-21
275_T7P_81	<i>E. coli</i> <i>S. citri</i>	Alpha-glucosidase	EFN70154	<i>Camponotus floridanus</i>	8,35E-17
334_T7P_28	<i>M. luteus</i>	annexin IX-like	NP_001155706	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	1,33E-24
327_T7P_39	<i>S. citri</i>	Asparagine synthetase	EGI58979	<i>Acromyrmex echinator</i>	1,99E-35
352_T7P_64	<i>S. citri</i>	GF21606	XP_001965080	<i>Drosophila ananassae</i>	1,22E-31
320_T7P_32	<i>S. citri</i>	GH24475	XP_001991945	<i>Drosophila grimshawi</i>	1,10E-24
179_T7P_83	<i>S. citri</i>	hypothetical protein DAPPUDRAFT_213420	EFX77541	<i>Daphnia pulex</i>	1,86E-24
202_T7P_10	<i>S. citri</i>	hypothetical protein SINV_15852	EFZ14571	<i>Solenopsis invicta</i>	4,89E-158
16_T7P_16	<i>S. citri</i>	long-chain acyl-CoA synthetases	ACJ64423	<i>Culex tarsalis</i>	3,06E-20
196_T7P_64	<i>M. luteus</i>	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase, putative	XP_002431052	<i>Pediculus humanus corporis</i>	2,91E-41
353_T7P_65	<i>S. citri</i>	NADP-dependent malic enzyme, putative	XP_002426680	<i>Pediculus humanus corporis</i>	6,51E-27
285_T7P_93	<i>S. citri</i>	PREDICTED: calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type-like	XP_003399858	<i>Bombus terrestris</i>	1,61E-16
SSH_T7P_74	<i>M. luteus</i>	PREDICTED: maltase 1-like	XP_003692294	<i>Apis florea</i>	0,452158
SSH_T7P_60	<i>M. luteus</i>	PREDICTED: similar to fatty acid synthase	XP_970417	<i>Tribolium castaneum</i>	2,91E-57
244_T7P_52	<i>S. citri</i>	PREDICTED: similar to ribose-phosphate pyrophosphokinase 1, putative isoform 3	XP_976064	<i>Tribolium castaneum</i>	2,15E-107

142_T7P_46	<i>S. citri</i>	putative ATP synthase oligomycin sensitivity conferral protein	ABD98749	<i>Graphocephala atropunctata</i>	3,53E-21
427_T7P_92	<i>E. coli</i> <i>S. citri</i>	putative ATP-binding cassette sub-family E member 1	ABN11928	<i>Maconellicoccus hirsutus</i>	1,04E-80
36	<i>E. coli</i> <i>S. citri</i>	putative nucleoside diphosphate kinase	ABD98737	<i>Graphocephala atropunctata</i>	3,15E-56
<b>Cytosquelette</b>					
222_T7P_28	<i>E. coli</i>	actin, partial	AFG33344	<i>Euphaea decorata</i>	6,95E-60
187_T7P_91	<i>S. citri</i>	TPA_exp: troponin T isoform 5	DAA05518	<i>Apis mellifera</i>	2,86E-50
<b>Réponse au stress</b>					
105_T7P_9	<i>M. luteus</i> <i>S. citri</i>	hsp70 family member	ADN29892	<i>Triatoma matogrossensis</i>	2,57E-59
80_T7P_80	<i>S. citri</i>	glutathione S-transferase sigma 3	AEB91975	<i>Locusta migratoria</i>	5,48E-19
269_T7P_77	<i>S. citri</i>	glutathione S-transferase sigma 7	AEB91979	<i>Locusta migratoria</i>	2,02E-43
383_T7P_95	<i>S. citri</i>	heat shock 90 protein	BAH83702	<i>Diaphorina citri</i>	1,01E-14
262_T7P_70	<i>S. citri</i>	PREDICTED: heat shock protein 83-like	XP_003704636	<i>Megachile rotundata</i>	7,52E-70
<b>Signalisation</b>					
84_T7P_84	<i>S. citri</i>	adenosine A3 receptor	AAG35154	<i>Callimico goeldii</i>	2,99352
293_T7P_11	<i>E. coli</i>	tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR1 isoform 2 precursor	NP_001077061	<i>Homo sapiens</i>	2,46E-36
198_T7P_6	<i>S. citri</i> <i>E. coli</i>	GTP cyclohydrolase I	NP_001232962	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	8,96E-66
233_T7P_41	<i>S. citri</i>	calcium-binding protein	GAA27855	<i>Clonorchis sinensis</i>	0,0014754
183_T7P_87	<i>S. citri</i>	Calmodulin	ADY48295	<i>Ascaris suum</i>	4,03E-05
60_T7P_60	<i>S. citri</i>	Chaoptin	EGI62972	<i>Acromyrmex echinatio</i>	2,07E-58
290_T7P_17	<i>M. luteus</i>	GK21401	XP_002063428	<i>Drosophila willistoni</i>	5,37E-74
125_T7P_29	<i>S. citri</i>	histocompatibility (minor) 13	NP_001096259	<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	1,28E-34
165_T7P_69	<i>S. citri</i>	MT2 melatonin receptor	AEK32457	<i>Paralichthys olivaceus</i>	8,59701
24_T7P_24	<i>S. citri</i>	PREDICTED: digestive cysteine proteinase 2-like	XP_003384331	<i>Amphimedon queenslandica</i>	3,70E-55
384_T7P_96	<i>S. citri</i>	putative cathepsin B.2	CAB97365	<i>Ostertagia ostertagi</i>	4,40E-16
267_T7P_75	<i>S. citri</i>	PREDICTED: probable nucleolar GTP-binding protein 1-like	XP_001952048	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	8,27E-87
331_T7P_43	<i>S. citri</i>	PREDICTED: similar to apoptosis stimulating of P53	XP_968601	<i>Tribolium castaneum</i>	0,133431

178_T7P_54	<i>M. luteus</i>	PREDICTED: similar to GTP-binding protein	XP_967515	<i>Tribolium castaneum</i>	2,63E-28
125_T7P_23	<i>M. luteus</i>	PREDICTED: similar to ran-binding protein	XP_967064	<i>Tribolium castaneum</i>	0,0237524
303_T7P_15	<i>S. citri</i>	putative inhibitor of apoptosis 1	ADK56128	<i>Lygus lineolaris</i>	4,24E-32
15_T7P_15	<i>S. citri</i>	putative rhodopsin	AAT01077	<i>Homalodisca vitripennis</i>	3,20E-36
161_T7P_42	<i>E. coli</i> <i>M. luteus</i> <i>S. citri</i>	serine protease	XP_001968385	<i>Drosophila erecta</i>	6,32E-11
246_T7P_54	<i>S. citri</i>	PREDICTED: trypsin-1-like	XP_003689751	<i>Apis florea</i>	4,85E-26
116_T7P_20	<i>S. citri</i>	sentrin/sumo-specific protease, putative	XP_002433046	<i>Pediculus humanus corporis</i>	1,05E-30
<b>Protéines hypothétiques</b>					
68_T7P_68	<i>S. citri</i>	conserved hypothetical protein	XP_002423284	<i>Pediculus humanus corporis</i>	5,92E-47
CIC_74.fa	<i>S. citri</i>	hypothetical protein AND_16433	EFR21761	<i>Anopheles darlingi</i>	1,19E-17
7_T7P_7	<i>S. citri</i>	hypothetical protein AND_11947	EFR23865	<i>Anopheles darlingi</i>	5,21E-90
487_T7P_87	<i>M. luteus</i>	hypothetical protein	XP_0014444050	<i>Paramecium tetraurelia</i>	9,20396
282_T7P_88	<i>E. coli</i>	hypothetical protein Bm1_17870	XP_001895031	<i>Brugia malayi</i>	2,15E-19
179_T7P_60	<i>E. coli</i>	hypothetical protein EAG_03557	EFN71375	<i>Camponotus floridanus</i>	0,0158888
39_T7P_39	<i>S. citri</i>	hypothetical protein EAI_03323	EFN85672	<i>Harpegnathos saltator</i>	1,52E-27
139_T7P_20	<i>E. coli</i>	hypothetical protein G5I_10987	EGI60789	<i>Acromyrmex echinator</i>	5,98431
111_T7P_15	<i>S. citri</i>	hypothetical protein SINV_01633	EFZ22908	<i>Solenopsis invicta</i>	0,228919
47_T7P_47	<i>S. citri</i>	hypothetical protein SINV_02731	EFZ19699	<i>Solenopsis invicta</i>	0,0040741
52	<i>E. coli</i>	hypothetical protein TcasGA2_TC005154	EFA12326	<i>Tribolium castaneum</i>	6,47E-33
CIC_90.fa	<i>S. citri</i>	hypothetical protein TcasGA2_TC005263	EFA12278	<i>Tribolium castaneum</i>	9,20E-36
298_T7P_35	<i>E. coli</i>	hypothetical protein TcasGA2_TC011522	EFA11365	<i>Tribolium castaneum</i>	8,95E-28
SSH_T7P_1	<i>M. luteus</i>	hypothetical protein WUBG_15727, partial	EJW73367	<i>Wuchereria bancrofti</i>	4,2396
131_T7P_35	<i>S. citri</i>	conserved hypothetical protein	XP_003883031	<i>Neospora caninum Liverpool</i>	8,13884
323_T7P_35	<i>S. citri</i>	conserved hypothetical protein	ACE75268	<i>Glyptapanteles flavicoxis</i>	0,0468635
<b>Autres</b>					
421_T7P_86	<i>E. coli</i>	GH17533	XP_001996691	<i>Drosophila grimshawi</i>	1,16777
359_T7P_6	<i>E. coli</i>	Male-specific lethal 1-like 1	EFN77332	<i>Harpegnathos saltator</i>	2,41E-42
214_T7P_22	<i>S. citri</i>	PREDICTED: similar to CG32019-PA	XP_971502	<i>Tribolium castaneum</i>	1,58E-40
358_T7P_70	<i>S. citri</i>	hypothetical protein Phum_PHUM052890	XP_002423360	<i>Pediculus humanus corporis</i>	1,47E-22
178_T7P_59	<i>E. coli</i>	lung cancer-specific antigen 4	ADX22475	<i>synthetic construct</i>	1,57E-05

263_T7P_71	<i>S. citri</i>	odorant binding protein 3	AEQ19909	<i>Laodelphax striatella</i>	1,73E-04
SSH_T7P_23	<i>M. luteus</i>	PREDICTED: cellulose synthase-like protein E6-like	XP_003635328	<i>Vitis vinifera</i>	1,70127
126_T7P_30	<i>S. citri</i>	PREDICTED: similar to Uncharacterized protein F54H12.3	XP_002163643	<i>Hydra magnipapillata</i>	0,0853931
178_T7P_82	<i>S. citri</i>	putative reverse transcriptase	BAK26811	<i>Culex quinquefasciatus</i>	8,85E-08
430_T7P_95	<i>E. coli</i>	senescence-associated protein	ACA04850	<i>Picea abies</i>	0,0012258
292_T7P_4	<i>S. citri</i>	Titin, putative	XP_002431692	<i>Pediculus humanus corporis</i>	0,232339
110_T7P_14	<i>M. luteus</i>	unnamed protein product	CBI23490	<i>Vitis vinifera</i>	1,30849
<b>Bactérie, Champignon, Virus</b>					
259_T7P_67	<i>S. citri</i>	ABC transporter, permease-ATP-binding protein	YP_005636761	<i>Xanthomonas campestris</i>	7,76466
54_T7P_54	<i>S. citri</i>	hypothetical protein	XP_728418	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	1,26E-07
313_T7P_84	<i>M. luteus</i>	ATP synthase F1, beta subunit	XP_002140752	<i>Cryptosporidium muris</i>	7,2726
412_T7P_77	<i>E. coli</i>	conserved hypothetical protein	CCG20003	<i>Taylorella asinigenitalis</i>	2,49E-05
330_T7P_42	<i>S. citri</i>	family 5 extracellular solute-binding protein	YP_004407747	<i>Verrucospora maris</i>	2,45679
317_T7P_29	<i>S. citri</i>	hemagglutinin esterase	CAR56929	<i>Infectious salmon anemia virus</i>	0,0185897
216_T7P_22	<i>E. coli</i>	hypothetical protein	XP_453712	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1,47633
124_T7P_22	<i>M. luteus</i>	hypothetical protein A1OC_04446	EJP78380	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4,71348
SSH_T7P_55	<i>M. luteus</i>	hypothetical protein AURDEDRAFT_165245	EJD45795	<i>Auricularia delicata</i>	3,07104
225_T7P_33	<i>S. citri</i>	hypothetical protein Bcoam_06385	ZP_03225808	<i>Bacillus coahuilensis</i>	0,388352
416_T7P_81	<i>E. coli</i>	hypothetical protein Csp_D29540	CBA31922	<i>Curvibacter putative symbiont of Hydra magnipapillata</i>	1,33E-10
337_T7P_49	<i>S. citri</i>	hypothetical protein Q5A_05617	ZP_10110792	<i>Serratia plymuthica</i>	2,43612
180_T7P_61	<i>E. coli</i>	hypothetical protein RUMGNA_02974	ZP_02042184	<i>Ruminococcus gnavus</i>	1,16E-11
37_T7P_37	<i>S. citri</i>	hypothetical protein RUMHYD_03539	ZP_03784059	<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	0,363069
283_T7P_91	<i>S. citri</i>	hypothetical protein Tola_1357	YP_002892558	<i>Tolomonas auensis</i>	7,04357
146_T7P_50	<i>S. citri</i>	hypothetical protein Turpa_1525	YP_006439679	<i>Turneriella parva</i>	0,908201
107_T7P_11	<i>S. citri</i>	hypothetical protein WQQ_10780	ZP_10317006	<i>Hydrocarboniphaga effusa</i>	6,34752
133_T7P_37	<i>S. citri</i>	lpxtg-motif cell wall anchor domain protein	YP_002752717	<i>Bacillus cereus</i>	5,06966
147_T7P_51	<i>S. citri</i>	maltose/maltodextrin ABC transporter permease protein MalG	ZP_06157311	<i>Photobacterium damsela</i>	0,631995
49_T7P_49	<i>S. citri</i>	Methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	CBF64715	<i>uncultured archaeon</i>	4,81E-09
CIC_118.fa	<i>S. citri</i>	nucleoplasmin isoform 1-like protein	ABM55590	<i>Maconellicoccus hirsutus</i>	1,49E-17
127_T7P_31	<i>S. citri</i>	unnamed protein product	CAK46987	<i>Aspergillus niger</i>	5,97986
9_T7P_9	<i>S. citri</i>	conserved hypothetical protein	CCA14391	<i>Albugo laibachii</i>	9,7584
245_T7P_53	<i>S. citri</i>	Methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	CBF64719	<i>uncultured archaeon</i>	1,70E-06

## **Etude de la réponse immunitaire de la cicadelle *Circulifer haematoceps* au cours de l'infection par *Spiroplasma citri*.**

*Spiroplasma citri* est une bactérie phytopathogène transmise par la cicadelle *Circulifer haematoceps*. L'absence de symptômes malgré la multiplication de *S. citri* dans l'hémolymphe, suggère que le système immunitaire joue un rôle important dans la tolérance de la cicadelle vis-à-vis du spiroplasme. Le but de cette thèse a donc été d'étudier la réponse immunitaire de *C. haematoceps* au cours de l'infection par *S. citri*.

Notre étude sur le système immunitaire de la cicadelle a montré la présence dans le plasma d'une activité antibactérienne et d'une activité phénoloxidase. Parmi les principaux types d'hémocytes une phagocytose des bactéries par les granulocytes et les plasmatoctes a été observée. Les gènes susceptibles d'être impliqués dans ces processus ont été recherchés par une approche par hybridation soustractive. De manière étonnante, aucun gènes codant des récepteurs ni d'effecteurs connus de l'immunité n'ont été identifiés. En revanche certains gènes (23 en tout) codent des protéines ayant potentiellement un rôle immunitaire. Six de ces 23 gènes ont été retenus pour suivre leur expression au temps précoce d'une infection bactérienne. Les résultats ont montré que les gènes codant l'Hexamérine, la DDBP1 et la Thiorédoxine peroxydase étaient surexprimés lors de l'infection par *S. citri*. Une approche fonctionnelle d'interférence par ARN a montré d'une part que l'Hexamérine était impliquée dans l'activité phénoloxidase et d'autre part qu'elle jouait un rôle important dans la survie de *C. haematococeps* au cours de l'infection par *S. citri*. En parallèle, le suivi de l'activité phénoloxidase et de la phagocytose au cours de l'infection a montré que *S. citri* était capable de s'adapter à la réponse immunitaire de l'insecte et d'y échapper. Ces résultats rejoignent ceux obtenus chez la drosophile concernant *S. poulsonii*.

**Mots-clés :** *Spiroplasma citri*, phénoloxidase, phagocytose, hémocytes, interférence par ARN, Hexamérine, hybridation soustractive.

## **Deciphering the immune response of the leafhopper *Circulifer haematoceps* during *Spiroplasma citri* infection.**

*Spiroplasma citri* is phytopathogenic bacteria transmitted by the leafhopper *Circulifer haematoceps*. The absence of symptoms despite the multiplication of *S. citri* in the hemolymph, suggests that the immune system plays an important role in the tolerance of the leafhopper towards the spiroplasma infection. The purpose of this thesis was to study the immune response of *C. haematoceps* during the infection by *S. citri*.

The characterization of the immune system of the leafhopper showed that an antibacterial activity and a phenoloxidase activity were present in the plasma. The main types of hemocytes were identified. Among them, granulocytes and plasmatoctes are capable to phagocyte bacteria. The genes involved in these immune processes were searched using subtractive hybridization method. Interestingly, none of the genes known to encode receptors or effectors of the immune system were identified. On the other hand 23 putative immune genes were identified. Six of these genes were retained to follow their expression in the early time of a bacterial infection. The results showed that the genes encoding Hexamerin, DDBP1 and Thioredoxin peroxidase were up-regulated during the infection by *S. citri*. A functional approach by gene silencing showed that Hexamerin was involved in the phenoloxidase activity and played an important role in the survival of *C. haematoceps* during the infection by *S. citri*. Finally, the follow-up of the phenoloxidase activity and phagocytosis by hemocytes showed an adaptation and an evasion of *S. citri* from the immune response of the insect, according to the results obtained for *S. poulsonii*-infected drosophila.

**Keywords :** *Spiroplasma citri*, phenoloxidase, phagocytosis, hemocytes, gene silencing, Hexamerine, subtractive hybridization.